



Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine dans l'endothelium vasculaire

Alice Gentil Dit Maurin

► To cite this version:

Alice Gentil Dit Maurin. Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine dans l'endothelium vasculaire. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. <tel-00507102>

HAL Id: tel-00507102

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00507102>

Submitted on 29 Jul 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Grenoble
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Laboratoire de Physiopathologie Vasculaire :
Interactions cellulaires, Signalisation et Vieillesse, U INSERM 882
CEA, Grenoble

THESE

Réalisée sous la direction du **Dr Philippe HUBER**
et sous la co-direction du **Dr Emmanuelle TILLET**

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Grenoble
Spécialité : Biologie Cellulaire

**Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine
dans l'endothélium vasculaire**

Présentée et soutenue publiquement par
Alice GENTIL DIT MAURIN
Le 2 Juillet 2010

Composition du jury :

Président du jury :	Dr René-Marc MEGE
Rapporteurs :	Dr Danièle MATHIEU Dr René-Marc MEGE
Examineurs :	Dr Muriel JACQUIER-SARLIN Pr Jean-Yves SCOAZEC Dr Emmanuelle TILLET Dr Philippe HUBER

Université de Grenoble
École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Laboratoire de Physiopathologie Vasculaire :
Interactions cellulaires, Signalisation et Vieillesse, U INSERM 882
CEA, Grenoble

THESE

Réalisée sous la direction du **Dr Philippe HUBER**
et sous la co-direction du **Dr Emmanuelle TILLET**

Pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Grenoble
Spécialité : Biologie Cellulaire

**Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine
dans l'endothélium vasculaire**

Présentée et soutenue publiquement par
Alice GENTIL DIT MAURIN
Le 2 Juillet 2010

Composition du jury :

Président du jury :	Dr René-Marc MEGE
Rapporteurs :	Dr Danièle MATHIEU Dr René-Marc MEGE
Examineurs :	Dr Muriel JACQUIER-SARLIN Pr Jean-Yves SCOAZEC Dr Emmanuelle TILLET Dr Philippe HUBER

REMERCIEMENTS

Je tiendrais tout d'abord remercier la Ligue Contre le Cancer (Comité de l'Isère) ainsi que l'ARC pour m'avoir soutenue financièrement durant mes 3 ans ½ de thèse.

Je remercie le Docteur René-Marc Mège et le Docteur Danièle Mathieu d'être les rapporteurs de ce travail. Merci au Docteur Muriel Jacquier-Sarlin, au Professeur Jean-Yves Scoazec pour leur participation à ce jury.

Je souhaiterais sincèrement remercier Philippe Huber, qui, en tant que Directeur du laboratoire et Directeur de thèse m'a accepté parmi son équipe et m'a ainsi permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire.

Je tiens à remercier chaleureusement ma co-directrice de thèse Emmanuelle Tillet pour son encadrement scientifique efficace, sa disponibilité ainsi que son écoute et ceci depuis mon M2 jusqu'à la fin de ma thèse. Merci encore pour son aide, pour l'inspiration, pour sa patience et pour le temps qu'elle a pu me consacrer.

Un grand merci aux autres membres du laboratoire, en particulier à Mme Marie-Hélène Prandini, à Melle Stéphanie Bouillot pour leur aide scientifique et leur contribution technique. J'exprime ma gratitude à tous les « jeunes » du laboratoire : thésards, techniciens et stagiaires (Tiphaine, Mélanie la Grande, Mélanie la Petite, Adeline, Marion, les Stéphanies (Stéph.H, Stép B, et Steph. R), Sandra, et Adama) de leurs nombreux conseils scientifiques prodigués qui ont très souvent permis de débloquer des petits problèmes techniques rencontrés au cours de mes expériences. Merci des bons moments que l'on a pu passer ensemble, en pièce café ou au cours de soirées conviviales.

Je n'oublie pas mes parents et en particulier mon père, sans qui, je n'aurais jamais pu en arriver là aujourd'hui.

Je garderais toujours un agréable souvenir de mon « lieu de vie de thésarde » : la coloc du « 22 chez l'Doc ». Merci à mes deux colocs : Tiphaine et Manue, de m'avoir supportée (surtout au début).

Je remercie Adeline pour les corrections qu'elle a pu apporter à mon manuscrit.

Jean-Charles, je te remercie également de m'avoir épaulée pendant cette période critique qu'est l'écriture de la thèse et merci pour t'être impliqué dans les corrections de mon manuscrit.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous mes proches et amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée pendant ma thèse.

Une fois de plus, un grand merci à tous.

RESUME

Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine dans l'endothelium vasculaire

L'intégrité de l'endothelium vasculaire est maintenue par des structures d'adhérence jonctionnelle, notamment les jonctions adhérentes, dont la VE-cadhérine est le constituant majeur. Cette cadhérine est exclusivement exprimée dans les cellules endothéliales et joue un rôle clé au cours de la formation du plexus vasculaire. Les cellules endothéliales expriment également une autre cadhérine : la N-cadhérine. Bien que possédant une forte homologie structurale avec la VE-cadhérine, celle-ci possède une localisation subcellulaire originale pour une cadhérine classique puisqu'elle est localisée de manière diffuse au niveau de la membrane. Dans le développement vasculaire, elle pourrait ainsi permettre le recrutement des cellules murales par l'endothelium conduisant à la stabilisation du vaisseau.

Mon travail de thèse a été d'analyser les propriétés différentielles de ces deux cadhérines dans la cellule endothéliale ainsi que le mécanisme d'exclusion jonctionnelle de la N-cadhérine. Nous avons montré que la VE- et la N-cadhérine interagissent similairement à l' α - et à la β -caténine mais à l'inverse, p120 caténine lie préférentiellement la VE-cadhérine. Cette propriété confère à la VE-cadhérine la capacité d'exclure la N-cadhérine de la jonction interendothéliale. D'autre part, nous avons montré qu'une petite proportion de la VE-cadhérine est enchâssée dans des microdomaines riches en cholestérol : les radeaux lipidiques, à laquelle p120 est très fortement associée. Cette fraction pourrait représenter un pool de VE-cadhérine assurant la stabilité de la jonction et le maintien de la force cohésive entre cellules endothéliales.

Nous avons également montré dans un modèle de différenciation cellulaire dérivé des cellules ES murines (embryonic stem cell), que l'expression de la VE-cadhérine était nécessaire à l'expression d'autres gènes endothéliaux : PECAM, Flk-1 et Tie-1. La VE-cadhérine exercerait un contrôle transcriptionnel de l'expression de ces gènes mais le mécanisme exact de régulation n'a pas pu être décrypté.

L'ensemble de ce travail permet donc de montrer un autre visage de la VE-cadhérine dans la biologie de l'endothelium qui serait de réguler des protéines-clé de l'endothelium.

Mots-clés :

Cellules endothéliales, VE-cadhérine, N-cadhérine, angiogenèse, p120 caténine, radeaux de cholestérol, PECAM.

ABSTRACT

Differential properties of N- and VE-cadherin in vascular endothelium

Endothelium integrity is maintained by junctional adhesion structures, in particular adherens junctions. Classical cadherins are the main molecule belonging to these structures. Two classical cadherins are expressed in the endothelium. First, the vascular endothelial cadherin or VE-cadherin is only expressed in endothelial cells and located to adherens junctions. Several studies have shown that this molecule is strictly necessary during vascular development. The second classical endothelial cadherin is represented by the neural cadherin or N-cadherin. Contrary to classical cadherins, the endothelial N-cadherin shows diffuse location on the entirely cell surface and interacts with mural cells for vessel stabilization. Moreover, its role in angiogenic process is still debated.

The purpose of our study was to decipher the differential role of N- and VE-cadherin in endothelial cells and during angiogenesis. We have shown that VE-cadherin was able to organize and displace N-cadherin location on the cell surface. Moreover, VE-cadherin binding to p120 catenin is required for N-cadherin junctional exclusion. Furthermore, endothelial lipid rafts, known to organize classical cadherin at the membrane, contain exclusively VE-cadherin, where it specifically binds p120 catenin. So, this protein complex could form a platform that stabilizes cadherin at the cell membrane and in the same way, strengthens intercellular interactions.

Also, we have found that three endothelial genes : PECAM, Flk-1 and Tie-2, could be transcriptionally controlled by VE-cadherin in a ES cell-derived endothelial differential model. We didn't found this molecular mechanism but, a cross talk between the VE-cadherin dependant PECAM regulation and adherens molecule to extracellular matrix is possible.

In the end, we characterized a new role of VE-cadherin. This adherent molecule might be crucial to endothelium biology, especially in the control of important endothelial proteins.

Key words:

Endothelial cells, VE-cadherin, N-cadherin, angiogenèse, p120 catenin, lipid raft, PECAM.

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père.

SOMMAIRE

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	I
------------------------------------	----------

LISTE DES FIGURES	III
--------------------------------	------------

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

ÉTAT DE L'ART	5
----------------------------	----------

I. LE RESEAU VASCULAIRE	7
--------------------------------------	----------

A. Généralités.....	7
---------------------	---

B. L'appareil circulatoire	8
----------------------------------	---

1. Les artères et les veines	8
------------------------------------	---

2. Les capillaires	9
--------------------------	---

3. Les vaisseaux lymphatiques.....	10
------------------------------------	----

C. L'endothelium vasculaire	11
-----------------------------------	----

1. Présentation de l'endothelium et de ses principales fonctions.....	11
---	----

2. Description des différents types d'endothelium	12
---	----

a. L'endothelium des artères et des veines	12
--	----

b. L'endothelium des capillaires.....	12
---------------------------------------	----

D. Formation de l'endothelium et des vaisseaux sanguins.....	13
--	----

1. Développement embryonnaire	13
-------------------------------------	----

a. La vasculogenèse.....	14
--------------------------	----

b. L'angiogenèse.....	16
-----------------------	----

L'angiogenèse par bourgeonnement.....	16
---------------------------------------	----

L'angiogenèse « non bourgeonnante » ou IMG.....	17
---	----

c. Maturation et stabilisation du réseau vasculaire	18
---	----

2. Formation des vaisseaux sanguins chez l'adulte	20
---	----

3. Angiogenèse et thérapies associées	20
---	----

II. STABILITE DE LA COHESION INTERENDOTHELIALE : ROLES DES COMPLEXES JONCTIONNELS	22
--	-----------

A. Structures jonctionnelles : généralités	22
--	----

B. La jonction serrée (TJ) interendothéliale	24
--	----

1. Présentation de la jonction serrée	24
---	----

2. Les principales molécules de la jonction serrée.....	25
---	----

a. Les claudines.....	25
b. L'occludine.....	25
c. Les protéines JAM.....	26
d. La molécule ESAM.....	27
C. Molécules d'adhérence n'appartenant pas à une structure jonctionnelle particulière	28
1. PECAM.....	28
a. Structure moléculaire de PECAM.....	28
b. PECAM et ses partenaires cytoplasmiques	29
β-caténine et SHP-2.....	29
γ-caténine.....	30
c. Fonction de la protéine PECAM	30
Rôle de PECAM dans l'angiogenèse.....	30
Importance de PECAM dans la transmigration leucocytaire	31
2. S-endo-1 (ou CD146 ou Muc 18) : structure et fonction.....	32
D. La jonction adhérente.....	33
1. Généralités	33
2. Les cadhérines classiques	35
a. Organisation moléculaire et assemblage homophilique	35
b. Les caténines : partenaires cytoplasmiques des cadhérines classiques.....	37
La β-caténine.....	37
La γ-caténine	39
p120.....	39
c. La E-cadhérine.....	40
d. La P-cadhérine.....	41
e. La N-cadhérine	42
Généralités et localisation.....	42
La N-cadhérine et la formation de la jonction adhérente.....	43
Fonctions de la N-cadhérine.....	46
Formation des circuits neuronaux et maintien de la synapse	46
Migration cellulaire.....	46
Contrôle de la myogenèse.....	47
Régulation de l'ostéogenèse.....	47
Rôle dans l'apoptose.....	48
La N-cadhérine : une cible thérapeutique.....	48
La N-cadhérine dans l'endothélium.....	49
Une localisation subcellulaire originale	49
Fonctions de la N-cadhérine au sein de l'endothélium.....	49
- Recrutement des péricytes au cours du développement vasculaire.....	49
- Transmigration des cellules cancéreuses	50
f. La VE-cadhérine	51
Découverte et patron d'expression.....	51
Organisation de la VE-cadhérine à la jonction	51
Base moléculaire de la fonction adhésive de la VE-cadhérine : assemblage homotypique hexamérique	52
Fonctions de la VE-cadhérine dans l'endothélium	54
Rôle de la VE-cadhérine dans l'organisation du réseau vasculaire.....	54
Modulation de la survie cellulaire.....	55
Régulation de la prolifération cellulaire.....	56

Rôle de la VE-cadhérine dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire	58
- Phosphorylation sur tyrosine du complexe adhérent à base de VE-cadhérine et contrôle de la perméabilité	58
* Phosphorylation de la VE-cadhérine	58
* Phosphorylation des caténines	60
- Modulation de la perméabilité par l'internalisation de la VE-cadhérine.....	61
- Clivage de la VE-cadhérine et ouverture des jonctions	61
La VE-cadhérine et la régulation de la progression tumorale : une cible thérapeutique antiangiogénique de premier ordre	61

III. LES RADEAUX LIPIDIQUES : CENTRES ORGANISATEURS DE LA MEMBRANE CELLULAIRE 63

A. Historique de la découverte de la théorie des radeaux.....	63
B. Description du radeau	64
1. Composition en molécules lipidiques	64
2. Caractéristiques des protéines associées aux radeaux	64
C. La Cavéole : un sous-type de radeau lipidique	66
D. Propriétés des radeaux au profit de leur extraction	67
E. Les radeaux lipidiques organisent la biologie de la cellule	67
1. Les radeaux et pathologies associées	68
a. Réponse immunitaire	68
b. Cancer	69
c. Maladies neurogénétiques.....	69
2. Organisation de l'adhérence cellulaire par les radeaux lipidiques	70
a. Organisation des molécules adhérentes.....	70
b. Organisation des molécules d'adhérence endothéliales.....	71

RESULTATS EXPERIMENTAUX..... 75

I. ÉTUDE DU RÔLE DE LA N- ET DE LA VE-CADHERINE DANS L'ENDOTHELIUM. 77

A. Analyse de la localisation différentielle de la N- et de la VE-cadhérine	77
1. Contexte scientifique	77
2. Principaux résultats	78
3. Article: Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells : a key role for p120-catenin.	79
4. Résultats complémentaires de l'article	111
a. Analyse de la N-cadhérine des cellules endothéliales.	111
Partenaires associés.....	111
Conséquence de l'extinction de la N-cadhérine.....	112
b. Analyse des radeaux lipidiques des cellules endothéliales	115
c. Analyse des radeaux lipidiques épithéliaux.	116
d. Analyse de la VE-cadhérine des radeaux de cholestérol.....	117

Spécificité d'association.....	118
Profil de phosphorylation.....	119
5. Discussion et perspectives	121
B. Étude du rôle différentiel de la N- de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse....	125
1. Contexte scientifique.....	125
2. Stratégie expérimentale.....	126
a. Construction et description des différentes VE-cadhérine murines mutantes.....	127
b. Modèles d'angiogenèse <i>in vitro</i> utilisés	128
3. Matériel et méthodes.....	128
4. Résultats	132
a. Modèles d'angiogenèse.....	132
Influence de l'invalidation de la VE-cadhérine sur l'organisation d'un réseau précapillaire : modèle en matrigel.....	132
Conséquences de l'invalidation de la VE-cadhérine sur la formation de la lumière endothéliale : modèle de vacuolisation.....	133
Modèle sphéroïde	136
b. Analyse de la double transfection : siRNA VE-cadhérine et VE-cadhérines mutantes	138
5. Discussion et perspectives	141
 II. REGULATION DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE PECAM PAR LA VE-CADHERINE.....	 143
1. Contexte scientifique.....	143
2. Matériel et méthodes.....	143
3. Résultats	146
a. Étude dans un modèle de différenciation endothéliale dérivée des cellules ES.....	146
Analyse protéique	146
Analyse des ARNm PECAM	148
Étude du mécanisme de régulation.....	150
Analyse épigénétique de l'expression de PECAM.....	150
Influence de l'adhérence à la MEC sur la régulation de l'expression de PECAM..	152
b. Expression de PECAM dans des HUVECs déficientes en VE-cadhérine.....	154
4. Discussion et perspectives	156
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES	 161
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

LISTE DES ABREVIATIONS

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*
Arp : *Actin-Related Protein*
ASIP : *Agouti Signaling Protein*
Bad : *Bcl-2 Antagonist of cell Death*
Canal TE : canal TransEndothélial
CBD : *Catenin-Binding Domain*
CHO : *Chinese Hamster Ovary*
Csk : *C-terminal Src Kinase*
CTD : *C-terminal Binding Domain*
DEP1 : *Density Enhance Phosphatase 1*
EB : *Embryoid Body*
EC : *EctoDomain*
E-cadherin : *Epithelial-cadherin*
EMT : *Epithelial-Mesenchymal Transition*
ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinase*
ESAM : *Endothelial Cell Adhesion Molecule*
FAK : *Focal Adhesion Kinase*
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FGF-R : *Fibroblast Growth Factor Receptor*
GPI : *Glycosyl-Phosphatidylinositol*
GSK : *Glycogene Synthase Kinase*
HEV : *High Endothelial Venules*
HUVEC : *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*
ICAM : *Intercellular Adhesion Molecule*
Ig : *Immunoglobuline*
IKK : *I KappaB Kinase*
IMG : *Intussusceptive Microvascular Growth*
ITIM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*
JAM : *Junctional Adhesion Molecule*
JMD : *JuxtaMembrane Domain*

Lef : *Lymphocyte-Enhancing Factor*
 MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
 MDCK : *Madin-Darby Canine Kidney*
 MEC : *Matrice ExtraCellulaire*
 MLC2 : *Myosin Light Chain 2*
 MMP : *Matrix Metalloproteinase*
 MBCD : *Méthyl-β-CycloDextrine*
 MUPP1 : *Multi-PDZ Protein 1*
 N-caderin : *Neural-cadherin*
 NES : *Nuclear Export Signal*
 NFκB : *Nuclear Factor-KappaB*
 NLS : *Nuclear Locating signal*
 PATJ : *PALS1-associated TJ protein*
 P-cadherin : *Placental-cadherin*
 PDGFB : *Platelet-derived growth factor subunit B*
 PDGFR-β : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta*
 PDZ : *Post-synaptic Disc-large Zonula*
 PECAM : *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*
 PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase*
 PKC : *Proteine Kinase C*
 S1P : *Sphingosine 1-Phosphate*
 S1P1 : *Sphingosine-1-Phosphate 1 receptor*
 SHP(1/2) : *Src homology phosphatase 1/2*
 Tcf : *T Cell Factor*
 VAP-33 : *VAMP Associated Protein-33*
 VE-cadherin : *Vascular Endothelial-cadherin*
 VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
 VEGFR-2 : *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2*
 VE-PTP : *Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase*
 VVO : *Vesiculo-Vacuolar Organelle*
 ZO : *Zonula Ocludens*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général de la circulation sanguine	7
Figure 2 : Anatomie de l'artère et de la veine.....	8
Figure 3 : Structure du capillaire sanguin	10
Figure 4 : Structure du vaisseau lymphatique.....	11
Figure 5 : Représentation schématique des cellules endothéliales des artères, des veines et des capillaires.....	13
Figure 6 : Schéma des différentes étapes de la formation du réseau vasculaire	14
Figure 7 : Etapes de la vasculogenèse.....	15
Figure 8 : Représentation des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	17
Figure 9 : Etapes de l'angiogenèse intussusceptive	18
Figure 10 : Stabilisation du vaisseau sanguin par le recrutement de cellules murales.....	19
Figure 11 : Organisation des structures d'adhérence le long du contact intercellulaire.	23
Figure 12 : Présentation de l'organisation et des principales molécules de la jonction serrée.	24
Figure 13 : Représentation schématique de la structure de la protéine PECAM.....	29
Figure 14 : Schéma représentatif des membres de la superfamille des cadhérines.....	34
Figure 15 : Représentation schématique d'une cadhérine classique au niveau d'une jonction adhérente	36
Figure 16 : Signalisation Wnt : rôle de la β -caténine	38
Figure 17 : Représentation schématique de l'export de la N-cadhérine à la membrane	43
Figure 18 : Modifications du complexe à base de N-cadhérine et de l'organisation de l'actine suite à la formation des premiers contacts intercellulaires.....	44
Figure 19 : Représentation schématique de la formation du lamellipode suite aux premières interactions entre molécules de N-cadhérine de cellules voisines.....	45
Figure 20 : Organisation moléculaire du complexe à base de VE-cadhérine au sein des jonctions adhérentes.....	52
Figure 21 : Assemblage homotypique hexamérique de la VE-cadhérine.....	53
Figure 22 : Importance de la VE-cadhérine dans la formation du réseau vasculaire : comparaison des embryons et des sacs vitellins sauvages et déficients en VE-cadhérine.....	55
Figure 23 : Rôle du domaine de liaison de la VE-cadhérine pour la β -caténine dans la survie de la cellule endothéliale	56
Figure 24 : Schéma récapitulatif des différentes voies modifiant la stabilité des jonctions à base de VE-cadhérine.	60
Figure 25 : Illustration du radeau lipidique rassemblant des protéines au niveau de la bicouche lipidique.....	64
Figure 26 : Représentation schématique du radeau lipidique et de ses protéines associées	65
Figure 27 : Organisation structurale de la cavéole.....	66

Figure 28 : Organisation des molécules d'adhérence endothéliales par les radeaux lipidiques.....	73
Figure 29 : P120 et SHP-2 s'associent préférentiellement avec la VE-cadhérine.....	112
Figure 30 : L'extinction de la N- ou de la VE-cadhérine ne modifie pas l'expression des deux cadhérines.....	113
Figure 31 : Contrairement à la régulation de la localisation de la N-cadhérine par la VE-cadhérine, la N-cadhérine n'organise pas la localisation de la VE-cadhérine.....	114
Figure 32 : Les radeaux lipidiques des cellules endothéliales se concentrent au niveau des contacts intercellulaires.....	115
Figure 33 : Les molécules de la jonction adhérente des cellules épithéliales (MDCK) colocalisent avec des marqueurs des radeaux lipidiques.....	117
Figure 34 : Le traitement au cholestérol oxydase ne perturbe pas la localisation de la VE-cadhérine.....	118
Figure 35 : La VE-cadhérine des radeaux lipidiques (RL) ne présente pas de profil de phosphorylation particulier.....	120
Figure 36 : Stratégie adoptée pour évaluer l'activité angiogénique de domaines moléculaires de la VE-cadhérine	126
Figure 37 : Représentation schématique des différentes VE- et N-cadhérines murines mutantes	127
Figure 38 : Au sein du modèle matrigel, l'absence de VE-cadhérine désorganise les structures précapillaires.....	133
Figure 39 : Effet de la déficience en VE-cadhérine sur la formation des vacuoles et sur la formation de la lumière endothéliale	134
Figure 40 : Vérification de l'extinction de l'expression de la VE-cadhérine suite au traitement siRNA dans le modèle de vacuolisation.....	135
Figure 41 : Localisation subcellulaire de marqueurs endothéliaux au sein du modèle de vacuolisation.....	136
Figure 42 : Aspect des sphéroïdes d'HUVECs et des bourgeons endothéliaux formés suite à un traitement avec un siRNA VE-cadhérine	137
Figure 43 : L'inhibition de l'expression de la VE-cadhérine par les siRNA VE-cadhérine n'empêche pas l'expression des différentes VE-cadhérine mutantes.....	140
Figure 44 : L'absence de VE-cadhérine régule négativement l'expression de PECAM.	147
Figure 45 : La déficience en VE-cadhérine induit une baisse des ARNm codant pour la protéine endothéliale PECAM (CD31).....	148
Figure 46 : La déficience en VE-cadhérine induit une baisse des ARNm codant les endothéliales Tie-1 et Flk-1.....	150
Figure 47 : La régulation de l'expression de PECAM par la VE-cadhérine n'est pas corrélée au niveau d'acétylation des histones.....	151
Figure 48 : Localisation de la VE-cadhérine et de la protéine PECAM au sein de corps embryoides sauvages (WT) ou déficients en VE-cadhérine (VE-cadhérine-/-) de 6 jours, au bout de 1 (J6+J1), 2 (J6+J2) ou 3 (J6+J3) jours d'étalement	152
Figure 49 : L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire semble être impliquée dans le mécanisme de régulation de l'expression de PECAM VE-cadhérine dépendante	153

Figure 50 : L'inhibition de l'expression de la VE-cadhérine dans les HUVECs régule positivement l'expression de la protéine PECAM..... 155

INTRODUCTION

Les vaisseaux sanguins possèdent, au niveau de leur face interne, une monocouche cellulaire qui est en contact direct avec le sang et appelée endothelium vasculaire. Ce tissu se compose de cellules endothéliales et joue un rôle fondamental dans la biologie du vaisseau puisqu'il permet, entre autres, de contenir le sang tout en autorisant le passage de cellules ou l'échange de substance nutritive avec le milieu extérieur. Le passage de molécules est possible grâce une régulation précise de l'écartement des cellules endothéliales entre elles, qui est sous le contrôle direct de structures composées de molécules d'adhérence. Parmi ces structures, la jonction adhérente, dont le composant moléculaire central est la cadhérine classique, occupe une place importante dans le contrôle de la perméabilité vasculaire. L'endothelium exprime des cadhérines classiques dont les deux principales sont la VE-cadhérine et la N-cadhérine. La première est spécifique des cellules endothéliales alors que la seconde est présente dans d'autres types cellulaires. Brièvement, ces deux cadhérines possèdent un domaine extracellulaire composé de 5 domaines répétés de type cadhérine, un unique domaine transmembranaire leur permettant d'être enchâssées dans la membrane et un domaine cytoplasmique comportant des sites de liaison à des partenaires cytoplasmiques extrêmement conservés comme les caténines α -, β -, γ -caténine et p120. La N- et la VE-cadhérine ne présentent, cependant, pas la même localisation subcellulaire. La N-cadhérine endothéliale présente une localisation subcellulaire originale pour une cadhérine classique. Contrairement à la N-cadhérine non-endothéliale et à la VE-cadhérine qui s'observent à la jonction intercellulaire, sa localisation membranaire est diffuse (Salomon et al., 1992) (Navarro et al., 1998) (Jaggi et al., 2002). Par ailleurs, la VE- et la N-cadhérine endothéliale possèdent des fonctions globales différentes dans le développement vasculaire. La VE-cadhérine est la molécule clé dans des étapes précoces de la formation du plexus vasculaire. La N-cadhérine serait plutôt impliquée dans des étapes plus tardives notamment au cours de la stabilisation du réseau vasculaire. Par conséquent, même si ces deux cadhérines possèdent une structure globale relativement similaire, ceci ne semble pas être suffisant pour qu'elles exercent des fonctions proches dans l'endothelium vasculaire.

Mon travail de thèse a donc consisté à l'analyse de ces deux cadhérines endothéliales notamment en étudiant et en décryptant les propriétés respectives de la N- et de la VE-cadhérine au sein de l'endothelium vasculaire et au cours de l'angiogenèse. Dans une introduction bibliographique, ma thèse récapitule toutes les données obtenues depuis des années concernant ces deux cadhérines.

Mon travail de recherche a consisté, dans un premier temps, à étudier la localisation subcellulaire des deux cadhérines ainsi que les mécanismes moléculaires régissant ces localisations. Les résultats obtenus ont permis de mettre en lumière le rôle important de la liaison de p120 à la VE-cadhérine dans la régulation de la localisation de la N-cadhérine. Également,

pour la première fois, l'association d'un pool de VE-cadhérine aux radeaux de cholestérol, connus pour organiser les molécules de cadhérines dans des cellules myoblastiques ou épithéliales, a été mise en évidence. Ces résultats font l'objet d'une publication en cours de soumission dans le journal scientifique : *Experimental Cell Research*. Des résultats complémentaires ont permis de montrer une association différentielle d'une phosphatase : SHP-2 aux deux cadhérines. Cette association pourrait avoir une signification particulière dans la biologie vasculaire. Par ailleurs, le rôle spécifique de domaines protéiques de la N- par rapport à la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse a été étudié. Deux régions de la VE-cadhérine potentiellement importantes pour sa spécificité fonctionnelle : le domaine de liaison à la β -caténine et le domaine extracellulaire ont été analysés. La stratégie que nous avons adoptée a été d'analyser l'activité angiogénique de cellules endothéliales exprimant des molécules de VE- et de N-cadhérine mutantes au sein de modèles d'angiogenèse *in vitro*. Pour cela, des plasmides codant pour les molécules de VE- et de N-cadhérine chimériques portant les deux domaines interchangeés, nous ont permis de générer des cellules endothéliales exprimant ces différentes cadhérines mutantes. Afin de tester l'activité angiogénique des différentes cadhérines mutantes, nous avons également mis au point 3 modèles d'angiogenèse *in vitro* représentés par le modèle matrigel qui permet le développement de structures précapillaires, le modèle sphéroïde qui permet de montrer la capacité qu'ont les cellules à former des structures bourgeonnantes et enfin le modèle de vacuolisation qui permet d'analyser la formation de la lumière endothéliale par vacuolisation. Ce travail n'a malheureusement pas pu aboutir car nous nous sommes heurtés à des taux de transfection des VE-cadhérines mutantes très bas qui ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats interprétables.

Enfin, nous avons constaté, de manière surprenante, le rôle important de la VE-cadhérine dans la régulation de l'expression de gènes endothéliaux comme le gène PECAM, Flk-1 et Tie-1 et ceci au niveau transcriptionnelle. Le mécanisme de régulation de l'expression de PECAM régit par la VE-cadhérine a été étudié et constitue le dernier volet de résultats de ma thèse. Nous avons pu montrer que des régulations épigénétiques, comme l'acétylation des histones, n'étaient pas responsables d'une telle régulation d'expression. Cependant, nous avons observé que ce n'était pas la VE-cadhérine elle-même qui contrôlait l'expression de PECAM mais plutôt l'adhérence à la matrice extracellulaire. L'existence d'un dialogue croisé entre la VE-cadhérine et les molécules d'adhérences à la matrice extracellulaire comme les intégrines pourrait être envisagé pour expliquer ces résultats.

ÉTAT DE L'ART

I. Le réseau vasculaire

A. Généralités

La formation du réseau vasculaire est un des événements les plus précoces au cours de l'embryogenèse et représente une étape importante pour la croissance de l'embryon. Ce réseau est constitué de vaisseaux sanguins et de vaisseaux lymphatiques. Le réseau vasculaire s'organise sous la forme d'une arborescence (Cf. : **Figure 1**). Les plus gros vaisseaux prennent naissance à la base du cœur et deviennent de plus en plus petits et ramifiés à proximité des organes qu'ils irriguent.

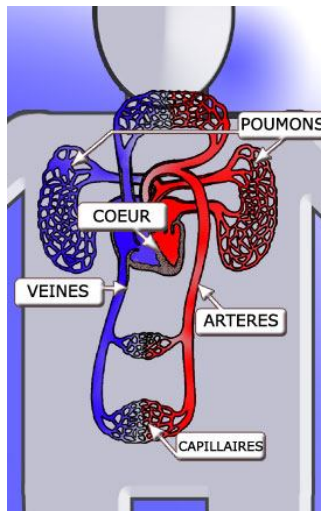


Figure 1 : Schéma général de la circulation sanguine

(D'après : http://www.pharmaxie.com/_phxcom/media/image/sante/circulation_sanguine.jpg)

Le réseau vasculaire est ici représenté en rouge et en bleu. Le rouge représente la circulation artérielle alors que le bleu représente la circulation veineuse. Les gros vaisseaux partent du cœur, se rétrécissent et forment des capillaires au niveau des organes à irriguer.

Les gros vaisseaux (artères, veines) sont des tuyaux conducteurs du sang alors que les petits vaisseaux que l'on nomme capillaires régulent le passage des molécules nutritives et des déchets organiques. Du fait de fonctions variées, ces vaisseaux présentent d'importantes différences morphologiques (Jain, 2003). Cependant une couche cellulaire que l'on nomme endothélium tapisse la face interne des vaisseaux et constitue la structure de base de chaque vaisseau. (Cf. **Figure 1**).

B. L'appareil circulatoire

1. Les artères et les veines

Les artères sont situées juste à la sortie du cœur et conduisent le sang du cœur aux autres organes de l'organisme. Il existe deux types d'artères. L'artère pulmonaire part depuis le ventricule droit du cœur et charrie un sang pauvre en oxygène. Ce sang rejoint la microcirculation pulmonaire et sera par la suite oxygéné au niveau des alvéoles pulmonaires. Les artères systémiques apportent le sang riche en oxygène et en nutriments vers les organes et sont constituées de trois couches concentriques : l'intima, la média et l'adventice (Cf. Figure 2).

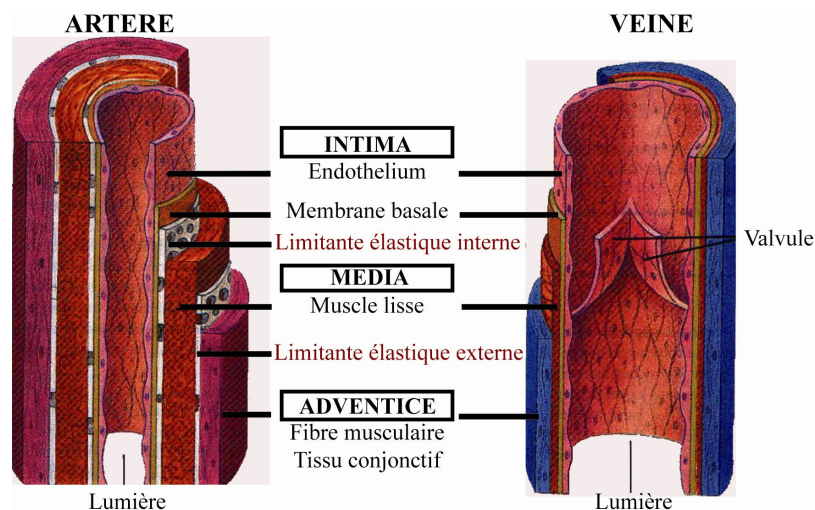


Figure 2 : Anatomie de l'artère et de la veine

(D'après : <http://bio.m2osw.com/gcartable/cardiologie/artereveincapil.gif>)

L'artère et la veine sont des gros vaisseaux. Ils présentent des structures communes : un endothélium, une membrane basale, une couche de cellules musculaires lisses et une couche de fibres musculaires. L'artère possède deux structures particulières : la limite élastique interne et externe. La fonction de ces vaisseaux est de lisser le flux sanguin pulsatile pour l'artère et de propulser le sang grâce à ses valvules pour la veine.

L'intima est en contact direct avec le sang et se compose d'un endothélium et d'un tissu conjonctif lâche. La média se constitue de fibres musculaires lisses, de fibres de collagène et de fibres d'élastine. Elle est limitée par une limite élastique interne circulaire et par une limite élastique externe longitudinale. Cette structure est spécifique à l'artère et permet de lisser le flux

pulsatile à la sortie du cœur. La troisième couche est l'adventice. Elle se caractérise par la présence de fibres de collagène et d'élastine ainsi que de cellules adipeuses.

À l'inverse, les veines assurent le retour veineux. Elles permettent le transport du sang riche en oxygène des poumons vers le cœur mais également le retour du sang des organes pauvres en oxygène vers le cœur. Bien que les veines présentent une organisation semblable aux artères, elles ne possèdent pas de limitante élastique et contiennent des valvules qui imposent le sens de circulation du sang et empêchent les retours. Les veines régulent le volume sanguin. Les veines de la circulation systémique peuvent contenir en effet jusqu'à 70% du volume sanguin total. Leur composante musculaire leur permet de mobiliser ce volume sanguin ce qui a pour effet d'augmenter le remplissage du cœur et le volume d'éjection systolique.

2. Les capillaires

Les vaisseaux de plus petits diamètres sont les vaisseaux sanguins les plus abondants de l'arbre vasculaire. Ils sont composés d'une couche de cellules endothéliales surmontée d'une couche de péricytes éparses (**Cf. Figure 3**).

Ces deux couches sont en contact grâce à une lame basale sécrétée par les deux types cellulaires. L'épaisseur de ces vaisseaux est très fine, ce qui constitue un site d'échange privilégié de nutriments entre le sang et les tissus. Le capillaire peut être différent en fonction du type d'organes qu'il perfuse. Cette différence est fonction de l'agencement des cellules endothéliales. Le capillaire est dit « continu » lorsque les cellules endothéliales sont très jointives. Ce type de capillaire se retrouve dans le muscle et le cerveau.

Le capillaire est dit « fenestré » quand il est formé d'une couche de cellules endothéliales beaucoup moins jointives. Le contact entre ces cellules est moins étroit et présente des pores. Le rein et les glandes endocrines présentent ce type de capillaires.

Le dernier type de capillaire est le capillaire « discontinu » formé d'une couche de cellules endothéliales et d'une lame basale discontinue. Le capillaire discontinu est observé dans le foie.

Capillaire sanguin

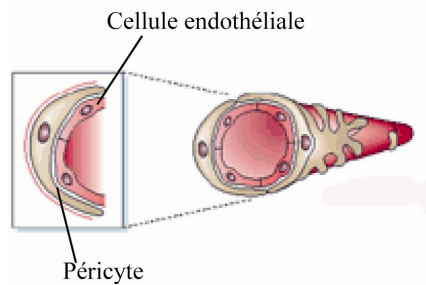


Figure 3 : Structure du capillaire sanguin

(D'après (Jain, 2003))

Les capillaires sanguins sont formés d'un endothélium surmonté de péricytes. Ils forment une barrière plus perméable comparée à celle des gros vaisseaux et facilitent ainsi le passage de molécules.

3. Les vaisseaux lymphatiques

La pression sanguine engendre une fuite continue du plasma des capillaires vers l'espace interstitiel. Ce liquide riche en protéines forme la lymphe. Le réseau lymphatique draine ce fluide vers la circulation sanguine. Les vaisseaux lymphatiques sont formés d'une monocouche de cellules endothéliales (**Cf. Figure 4**).

Celles-ci sont ancrées à la matrice extracellulaire grâce à des filaments d'ancrage constitués de filaments fins de collagène et ne sont pas recouvertes de péricytes. Les filaments d'ancrage relient l'endothélium lymphatique au tissu de soutien environnant pour éviter le collapsus de la lumière lymphatique. Les vaisseaux lymphatiques contiennent des valvules placées à intervalle régulier, ce qui permet le passage de la lymphe de manière unidirectionnelle. La fonction principale du système lymphatique est d'assurer la défense immunitaire de l'organisme. En effet, il permet de drainer les agents pathogènes (les virus, les bactéries), les débris cellulaires, les cellules cancéreuses mais aussi les cellules immunitaires comme les leucocytes et les cellules présentatrices de l'antigène. Ces constituants passent alors dans les ganglions lymphatiques. Ces structures concentrent les acteurs de la défense immunitaire et favorisent la rencontre des antigènes avec les cellules immunitaires.

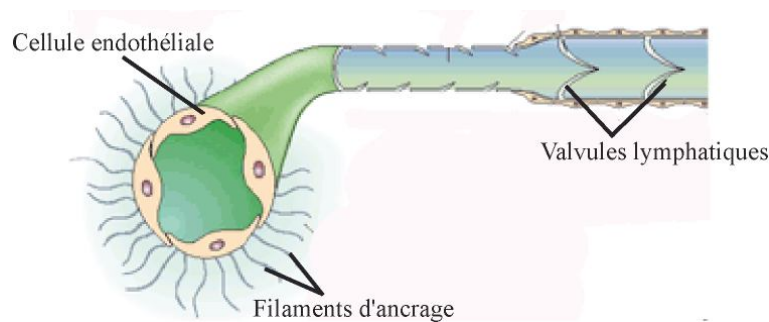


Figure 4 : Structure du vaisseau lymphatique

(D'après (Jain, 2003))

Les vaisseaux lymphatiques transportent la lymphe. Ils sont formés d'un endothélium qui est ancré à la matrice extracellulaire par des filaments d'ancrage. Ces vaisseaux possèdent des valvules.

C. L'endothelium vasculaire

1. Présentation de l'endothelium et de ses principales fonctions

Au sein d'un vaisseau sanguin, l'endothelium est un tissu de type épithélial qui se différencie des autres épithélia car il dérive du tissu mésodermique chez l'embryon. Les cellules endothéliales sont généralement des cellules plates et polarisées. En effet, le pôle apical représente la face cellulaire en contact direct avec le sang tandis que le pôle basal de la cellule repose sur une membrane basale. Les marqueurs protéiques spécifiques des cellules endothéliales sont peu nombreux car le plus souvent redondants avec d'autres types cellulaires. Cependant, la molécule d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales (PECAM, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) ainsi que la cadhérine endothéliale vasculaire (VE-cadhérine) représentent deux molécules permettant de caractériser les cellules endothéliales. L'endothelium remplit trois principales fonctions biologiques. Tout d'abord, l'endothelium permet de contenir et de canaliser le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il permet également l'échange de substances nutritives avec le milieu extérieur. Il peut être ainsi considéré comme un véritable filtre moléculaire. La deuxième fonction de l'endothelium est le contrôle de la coagulation sanguine. La cellule endothéliale inhibe la coagulation sanguine alors que la lame basale favorise l'agrégation plaquettaire. Enfin, l'endothelium participe activement au contrôle de la

vasomotricité. Les cellules endothéliales peuvent sécréter des hormones comme l'oxide nitrique qui induit la relaxation de la couche musculaire vasculaire et une vasodilatation.

2. Description des différents types d'endothelium

Il est important de noter que la morphologie de la cellule endothéliale est différente suivant le vaisseau sanguin considéré. Ces différences morphologiques coïncident précisément avec la fonction même du vaisseau étudié. Ainsi il n'existe pas « un » endothelium mais « des » endotheliums (Aird, 2007b) (Aird, 2007a).

a. L'endothelium des artères et des veines

Les cellules endothéliales des artères sont des cellules soumises à de fortes pressions sanguines. Ceci a des répercussions sur la forme de la cellule. En effet, ce sont des cellules longues, étroites qui ont un aspect étiré. De plus, les cellules ainsi que leurs noyaux sont alignés dans la direction du flux sanguin (**Cf. Figure 5**). Les cellules endothéliales des veines ne présentent pas une telle morphologie. Ce sont des cellules étroites, petites qui ne s'alignent pas en direction du flux sanguin. Les cellules endothéliales des artères et des veines ont cependant une organisation similaire, elles sont très jointives.

b. L'endothelium des capillaires

Les cellules des capillaires présentent à elles seules la plus grande diversité morphologique. L'endothelium des capillaires est le seul endothelium qui permet le passage de molécules et des cellules sanguines en situation physiologique. Ainsi, les cellules endothéliales sont moins jointives et présentent des structures particulières comme les organelles vesiculo-vésiculaires (ou VVO), les canaux transendothéliaux et les cavéoles qui favorisent le passage d'éléments sanguins. Les cellules de ces endotheliums peuvent également ne pas établir de contacts (**Cf. Figure 5**).

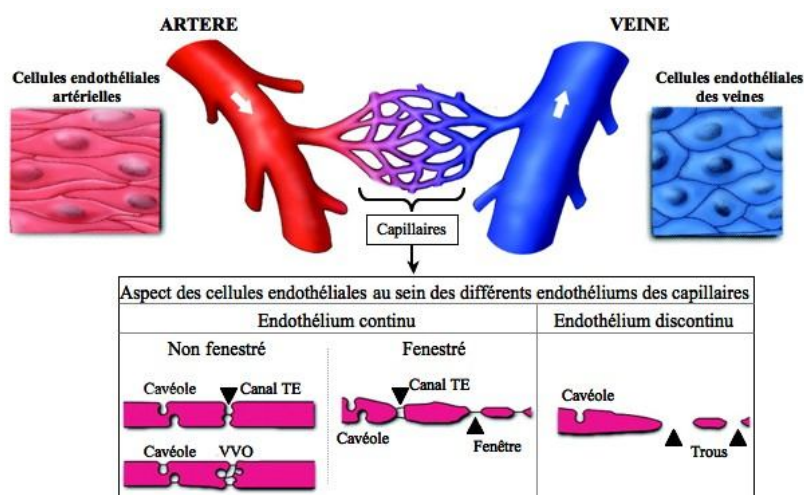


Figure 5 : Représentation schématique des cellules endothéliales des artères, des veines et des capillaires

(D'après (Aird, 2007b))

Les cellules endothéliales des artères sont des cellules allongées, prismatiques et orientées dans le sens de la circulation sanguine. Les cellules endothéliales des veines sont des cellules moins allongées que les cellules endothéliales des artères. Les cellules endothéliales des capillaires présentent des structures qui les caractérisent comme les cavéoles, le canal transendothélial (ou canal TE) et les organelles vésiculo-vésiculaires (VVO, Vesiculo-Vacuolar Organelle). Ces structures rendent l'endothélium plus perméable. La disposition des cellules permet de classer l'endothélium ainsi formé. L'endothélium continu est un endothélium plus jointif et peut être fenestré ou non fenestré. L'endothélium discontinu est l'endothélium le plus perméable.

D. Formation de l'endothélium et des vaisseaux sanguins

1. Développement embryonnaire

La croissance d'un embryon est dépendante de la formation d'un plexus vasculaire fonctionnel. La formation des vaisseaux sanguins au cours du développement embryonnaire dépend de trois processus biologiques successifs (**Cf. Figure 6**). La vasculogenèse est la première étape de la formation du vaisseau. Elle assure non seulement la différenciation de cellules d'origine mésodermique en cellules endothéliales mais induit également la formation d'un réseau vasculaire primaire à partir des cellules endothéliales alors différenciées. L'angiogenèse est l'étape qui suit la vasculogenèse. Elle permet l'extension du réseau vasculaire primitif. Ainsi de nouveaux

vaisseaux sont formés à partir des vaisseaux préexistants. Le réseau vasculaire subit par la suite des étapes de maturation qui permettent de le stabiliser.

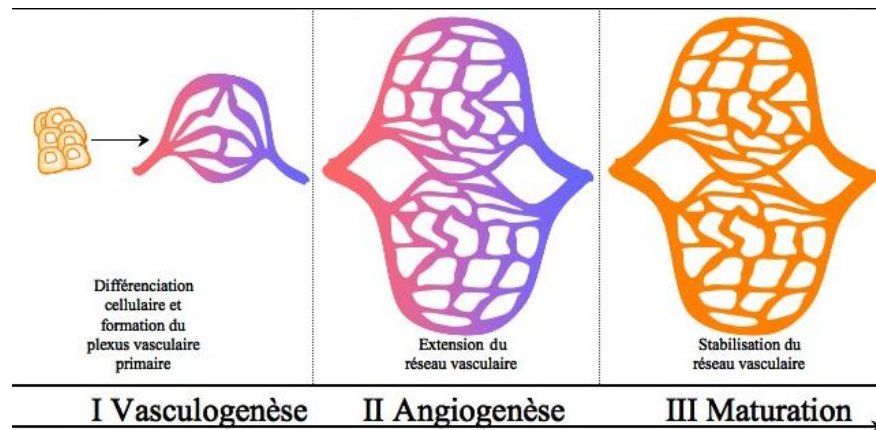


Figure 6 : Schéma des différentes étapes de la formation du réseau vasculaire

La formation du réseau vasculaire se caractérise par trois étapes principales. La vasculogénèse permet la différenciation de cellules précurseurs en cellules endothéliales qui s'organisent par la suite en réseau vasculaire primaire. L'angiogénèse permet l'extension du plexus vasculaire primaire. Ce réseau subit une étape de maturation qui permet ainsi la stabilisation du réseau vasculaire

a. La vasculogénèse

Le sac vitellin est le premier site de vasculogénèse. Ce site renferme des îlots sanguins formés d'hémangioblastes. Ces cellules sont les précurseurs cellulaires communs aux cellules endothéliales et aux cellules hématopoïétiques. Sous l'impulsion de facteurs de croissance environnants, ces cellules entament des processus de différenciation. En effet, les hémangioblastes à la périphérie des îlots sanguins se différencient en angioblastes (**Cf. Figure 7**). Ces cellules donnent les cellules endothéliales et se connectent entre elles pour former le premier réseau de capillaires. Les cellules qui se trouvent alors à l'intérieur du capillaire primaire sont les cellules précurseurs des cellules hématopoïétiques. Une fois différenciées, les cellules endothéliales forment la lumière endothéliale. Chez les embryons de poissons zèbres mais également dans des modèles de tubulogénèse *in vitro*, la lumière endothéliale se forme à partir de la fusion de petites vésicules intracellulaires formées au sein des cellules endothéliales (Kamei et al., 2006) (Yang et al., 1999) (Koh et al., 2008). Ceci permet la création d'un « trou » à l'intérieur de la cellule formant l'ébauche de la lumière endothéliale. Cependant, récemment, un autre mécanisme de la formation de la lumière endothéliale a été décrit *in vivo* chez l'embryon de souris

et chez l'embryon de poisson zèbre (Blum et al., 2008) (Strilic et al., 2009). Dans ce modèle, la lumière de l'aorte se constitue à partir de vésicules extracellulaires qui se forment au point de contact entre les cellules endothéliales adjacentes. La cadhérine endothéliale vasculaire (ou VE-cadhérine pour Vascular Endothelial-cadherin) et le facteur A de croissance vasculaire des cellules endothéliales vasculaire (VEGF-A pour Vascular Endothelial Growth Factor-A) semblent être les deux principales molécules pilotant ce mécanisme (Strilic et al., 2009). Ce modèle ne remet pas en question le précédent, mais constituerait un mécanisme additionnel à la formation de la lumière endothéliale.

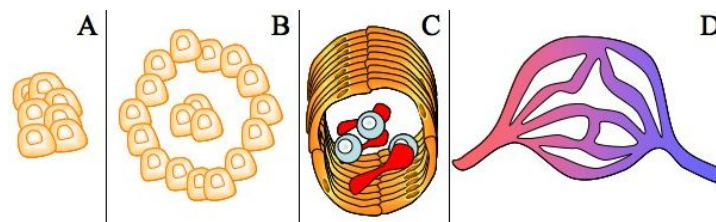


Figure 7 : Etapes de la vasculogenèse

Au sein des îlots sanguins, les hémangioblastes (A) se différencient en deux types cellulaires : les angioblastes et les cellules précurseurs des cellules hématopoïétiques. Les angioblastes sont les précurseurs des cellules endothéliales et sont présentes à la périphérie des îlots (B et C). Les cellules encadrées par les angioblastes sont les cellules précurseurs des cellules hématopoïétiques (B et C). Cette organisation cellulaire permettra la formation d'un réseau vasculaire primaire (D).

Au sein de l'embryon, la vasculogenèse forme la circulation extra-embryonnaire du sac vitellin, le cœur primitif ainsi que le plexus vasculaire primaire propre à l'embryon comme l'aorte dorsale, les veines vitellines. Le bon déroulement de la vasculogenèse dépend de nombreux facteurs. Le facteur de croissance fibroblastique (FGF, Fibroblast Growth Factor) ainsi que le VEGF sont impliqués dans la phase précoce de la vasculogenèse car ils permettent la différenciation des hémangioblastes. Le récepteur 2 au VEGF (VEGFR-2, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 également appelé Flk-1) est important pour la survie des hémangioblastes. En effet, les embryons de souris déficients en VEGF-R2 ne développent ni réseau vasculaire ni aucune cellule hématopoïétique suggérant que les deux lignées sont touchées (Shalaby et al., 1995). Plus tard, l'expression progressive de molécules d'adhérence interendothéliale comme la VE-cadhérine, les connexines et l'occludine permet la mise en place de structures aboutissant à la stabilisation du capillaire primaire (Ribatti et al., 2009). Des facteurs comme les récepteurs aux angiopoïétines : Tie-1 et Tie-2 ainsi que la molécule de signalisation

Hedgehog sont importants au cours de la phase tardive de la vasculogenèse, notamment au cours de la stabilisation du capillaire primaire. En effet, les embryons murins déficients en Tie-1 et Tie-2 ainsi que les embryons de poulet déficients en protéine Hedgehog, présentent des structures vasculaires fortement désorganisées (Sato et al., 1995) (Vokes et al., 2004).

b. L'angiogenèse

L'angiogenèse permet d'étendre le réseau vasculaire primitif résultant de la vasculogenèse. Cette extension de réseau se matérialise par deux processus distincts : l'angiogenèse par bourgeonnement de structure endothéliale et la croissance microvasculaire intussusceptive (IMG, Intussusceptive Microvascular Growth).

♦ L'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement, comme son nom l'indique, consiste en la formation de structure endothéliale bourgeonnante allant se connecter au vaisseau voisin. Le bourgeonnement des capillaires fut observé pour la première fois en 1895 au sein de la membrane chorio-allantoïde chez le poulet.

Le processus de bourgeonnement fait intervenir plusieurs étapes successives. Tout d'abord, la membrane basale des cellules endothéliales est localement dégradée par des collagénases ou des métalloprotéases ce qui permet aux cellules de se dégager du vaisseau et de migrer en direction du stimulus angiogénique (**Cf. Figure 8**). La migration des cellules endothéliales soumises à des stimuli angiogéniques est assurée principalement par des molécules d'adhérence à la matrice extracellulaire (MEC) comme les intégrines. L'intégrine spécifique de cette migration est l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ (Eliceiri and Chersesh, 1999). Par la suite, ces cellules s'alignent suivant un mode bipolaire et forment la lumière endothéliale. Le mécanisme de formation de la lumière endothéliale reste encore inconnu. Cependant il semblerait qu'elle se forme à partir de la fusion de vésicules intracellulaires et intercellulaires (Kamei et al., 2006) (Baldessari and Mione, 2008).

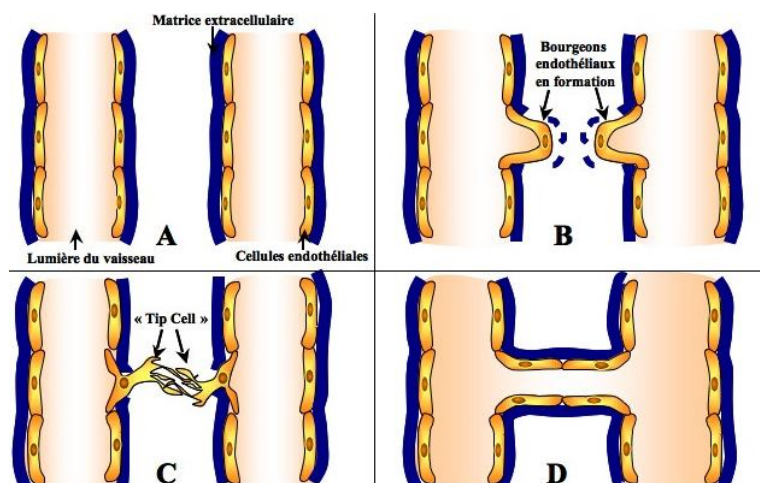


Figure 8 : Représentation des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.

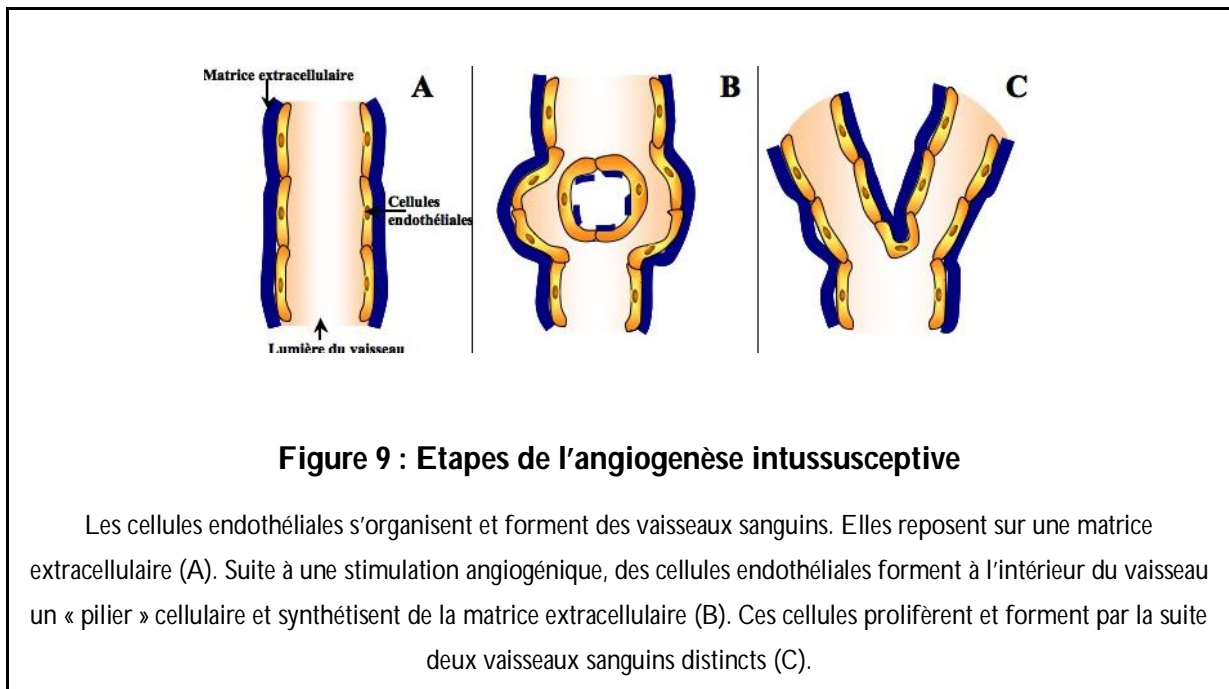
Les cellules endothéliales forment des vaisseaux sanguins et reposent sur une matrice extracellulaire (A). Suite à un stimulus angiogénique, les cellules endothéliales dégradent cette matrice, changent d'aspect, commencent à migrer et forment un bourgeon endothélial (B). Les cellules « meneuses » des bourgeons sont appelées tip cells (C). Elles dirigent les vaisseaux au cours de leur formation et permettent l'interconnection entre deux vaisseaux (D).

Le VEGF et plus précisément le VEGF-A est la molécule clé de l'angiogenèse notamment au cours de la migration et la prolifération des cellules endothéliales. En effet, ce facteur de croissance spécifique des cellules endothéliales agit comme un agent chimioattractant et permet l'assemblage correct des cellules endothéliales en tubes (Keyt et al., 1996) (Carmeliet and Collen, 1999). De plus, il semblerait que l'angiopoïétine-2 (Ang-2) module la fonction du VEGF et favorise ainsi le bourgeonnement endothélial (Maisonpierre et al., 1997). Le VEGFR-1 est une autre molécule indispensable pour l'angiogenèse car il permet le remodelage actif du plexus vasculaire. Les souris déficientes pour le VEGFR-1 présentent en effet, un réseau vasculaire restreint (Fong et al., 1995). Le VEGFR-2 semble être important dans l'orientation des cellules de l'extrémité des capillaires en croissance appelée « tip cells ». Au bout de ces « tip cells », de nombreux filopodes se forment et le blocage de l'activité du VEGF-R2 par des anticorps spécifiques inhibe la formation de ces filopodes (Gerhardt et al., 2003).

♦ L'angiogenèse « non bourgeonnante » ou IMG

La croissance microvasculaire intussusceptive (IMG) fut mise en évidence pour la première fois à la fin des années 80 par l'équipe de Caduff. Ils observèrent la formation de petits trous au sein du réseau vasculaire pulmonaire de souris en développement (Caduff et al., 1986).

L'IMG se caractérise par la formation d'un pilier cellulaire central au sein même d'un vaisseau sanguin (Cf. **Figure 9**).



En effet, les cellules endothéliales diamétralement opposées se rapprochent et entrent en contact. Cette phase s'accompagne d'un remodelage important des jonctions interendothéliales. À ce moment, le vaisseau possède deux lumières. Ces deux lumières se séparent physiquement ce qui permet la formation de deux vaisseaux distincts. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent ce processus restent encore non élucidés. Cependant, il semblerait que les récepteurs à activité tyrosine kinase Tie-1 et -2 et les angiopoïétines jouent un rôle fondamental pendant l'IMG (Patan, 1998) (Williams et al., 2006).

c. Maturation et stabilisation du réseau vasculaire

Cette phase permet au réseau vasculaire alors en croissance de se stabiliser et de rentrer dans une phase de quiescence. Cette étape est donc cruciale pour la stabilité du vaisseau. L'étape de maturation est fréquemment compromise au cours de pathologies, particulièrement au sein de la vasculature tumorale. Le programme de maturation du vaisseau est depuis longtemps associé au recrutement de cellules d'origine mésenchymateuse (péricytes et cellules musculaires lisses, Cf. **Figure 10**).

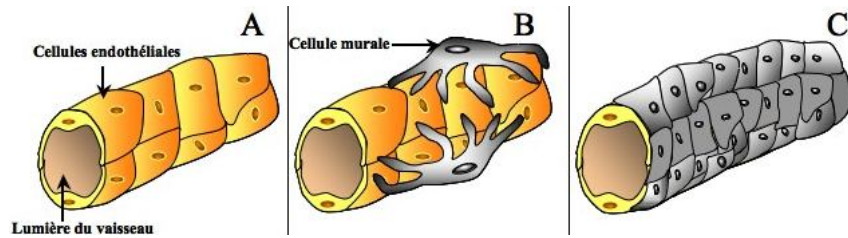


Figure 10 : Stabilisation du vaisseau sanguin par le recrutement de cellules murales.

Suite à l'angiogenèse, le réseau vasculaire a été ainsi étendu. Les cellules endothéliales forment les vaisseaux mais cette organisation reste cependant instable (A). Les cellules endothéliales sécrètent alors des molécules qui permettent le recrutement de cellules murales (B). Le recouvrement des cellules endothéliales par les cellules murales stabilise ainsi le vaisseau sanguin (C).

Les péricytes recouvrent l'endothelium des capillaires, alors que les cellules musculaires lisses entourent les vaisseaux de plus grand diamètre comme les artères ou les veines et sont séparés des cellules endothéliales par la membrane basale (Adams and Alitalo, 2007).

La migration des cellules murales vers le vaisseau sanguin ainsi que le recrutement et l'incorporation de ces cellules dans le vaisseau sanguin en formation sont induits principalement par une voie de signalisation faisant intervenir le récepteur β du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR- β , Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta) et son ligand: le PDGFB (Platelet-derived growth factor subunit B). En effet, le PDGFB sécrété par les cellules endothéliales des vaisseaux angiogéniques induit l'activation du PDGFR- β porté par les cellules murales. Ceci permet la migration des cellules murales en direction du site angiogénique et favorise la prolifération des cellules murales (Hoch and Soriano, 2003) (Tallquist et al., 2003). Cependant, bien que le recrutement des cellules murales au niveau de l'endothelium commence à stabiliser le vaisseau néo-vaisseau, les contacts entre les cellules endothéliales et les cellules murales restent encore fragiles. La protéine de la famille des protéines G : S1P1 (récepteur à la Sphingosine-1-Phosphate 1) permettrait le renforcement de l'interaction entre ces deux types cellulaires en organisant la localisation de la N-cadhérine (Allende et al., 2003) (Paik et al., 2004). En effet, S1P1 régule le trafic de la N-cadhérine précisément au niveau des contacts entre la cellule endothéliale et la cellule murale, ce qui renforcerait l'interaction entre ces deux cellules. Le rôle de la N-cadhérine dans la stabilisation des vaisseaux sera développé plus loin.

2. Formation des vaisseaux sanguins chez l'adulte

Chez un individu adulte, les vaisseaux sanguins sont le plus souvent quiescents. Bien que les cellules endothéliales adultes soient moins prolifératives, elles peuvent cependant et dans des cas bien définis, former de nouveaux vaisseaux. Par exemple, l'angiogenèse est notamment réactivée au cours du cycle ovarien pour permettre la formation de l'endomètre ou encore lors de la cicatrisation d'un tissu. En dehors de ces phénomènes, la réactivation importante de l'angiogenèse est très souvent associée à une pathologie : le cancer par exemple. La progression tumorale dépend clairement du « switch angiogénique ». Les cellules tumorales ont la capacité de sécréter toute une variété de molécules pro-angiogéniques comme le FGF et le VEGF-A qui, à lui seul, peut initier l'angiogenèse tumorale au sein d'une vasculature quiescente. Les cellules tumorales sécrètent d'autres membres de la famille du VEGF comme le VEGFC, le VEGFD. Ces molécules induisent la formation de nouveaux vaisseaux soit par le recrutement de cellules endothéliales proches du site tumoral ou bien par le recrutement de cellules progénitrices des cellules endothéliales qui sont produites dans la moelle osseuse (Lyden et al., 2001) (Khakoo and Finkel, 2005) (Kopp et al., 2008). Au sein de cet environnement pro-angiogénique créé par les cellules tumorales, les cellules endothéliales sont perpétuellement stimulées et incapables de former des vaisseaux stables. Ces vaisseaux sont en effet tortueux, hémorragiques et de forme irrégulière. De plus, les péricytes sont très peu associés à ces vaisseaux et ne peuvent donc plus les stabiliser (Bergers and Benjamin, 2003).

3. Angiogenèse et thérapies associées

Inhiber la formation des vaisseaux sanguins au sein de la tumeur est une piste thérapeutique empruntée de nos jours. La molécule la plus populaire utilisée en thérapie anti-angiogénique est l'Avastin. Cet anticorps monoclonal, créé par l'équipe de Ferrara (Etats Unis), est un anticorps anti VEGF-A. L'effet de l'anticorps sur la vasculature peut paraître surprenant puisque le traitement induit une normalisation de la vasculature (Heath and Bicknell, 2009). Cette normalisation est en fait bénéfique car elle favorise l'acheminement de molécules antitumorales au site tumoral.

A contrario, dans certains cas, réactiver « artificiellement » l'angiogenèse chez l'adulte représente une thérapie essentielle pour sauver un membre de l'ischémie. Le traitement consiste en l'injection de cellules endothéliales progénitrices isolées de la moelle osseuse du patient stimulé par des cytokines ou des facteurs de croissances endothéliaux (Zampetaki et al., 2008) (Kirton and Xu, 2010).

En conclusion, la survie d'un individu est donc strictement dépendante de la vasculogénèse et de l'angiogénèse qui permettent la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel. Au cours du développement, ce réseau permet la croissance des tissus via l'apport en éléments nutritifs essentiels. La formation d'un plexus vasculaire fonctionnellement et structurellement mature est régie par un contrôle spatiotemporel extrêmement fin de facteurs pro- ou anti-angiogéniques. Dans le cadre de l'angiogénèse tumorale, cette balance est complètement modifiée. Chez des patients atteints d'ischémie, la formation de nouveaux vaisseaux reste une thérapie de choix pour sauver l'organe en question.

II. Stabilité de la cohésion interendothéliale : rôles des complexes jonctionnels

A. Structures jonctionnelles : généralités

Dans un organisme pluricellulaire, les cellules sont rattachées entre elles par diverses structures membranaires spécialisées qui assurent ainsi une cohésion de l'ensemble du tissu. Le rôle cohésif de ces structures jonctionnelles a une importance capitale au sein de tissu. Elles forment ainsi une barrière perméable avec l'environnement. L'épithélium et l'endothélium sont deux exemples qui illustrent parfaitement cette idée. Ces deux barrières naturelles permettent respectivement de compartimenter les tissus entre eux ou de séparer le sang des tissus sous-jacents.

En plus de leur rôle adhésif, ces plateformes peuvent être modulables et deviennent de véritables structures de signalisation, modifiant profondément la biologie de la cellule. Les structures d'attachement sont matérialisées par diverses molécules d'adhérence transmembranaires. Le plus souvent ce sont les mêmes protéines de deux cellules voisines qui interagissent et permettent ainsi une liaison homophile. Les molécules d'adhérence de l'épithélium ont été les premières étudiées et restent encore les mieux décrites. Elles constituent ainsi un modèle de référence. Les molécules d'adhérence épithéliales s'organisent de manière précise le long de la jonction ce qui confère à la cellule sa polarité. La première structure qui se trouve du côté le plus apical est la jonction serrée ou jonction étanche (**Cf. Figure 11**).

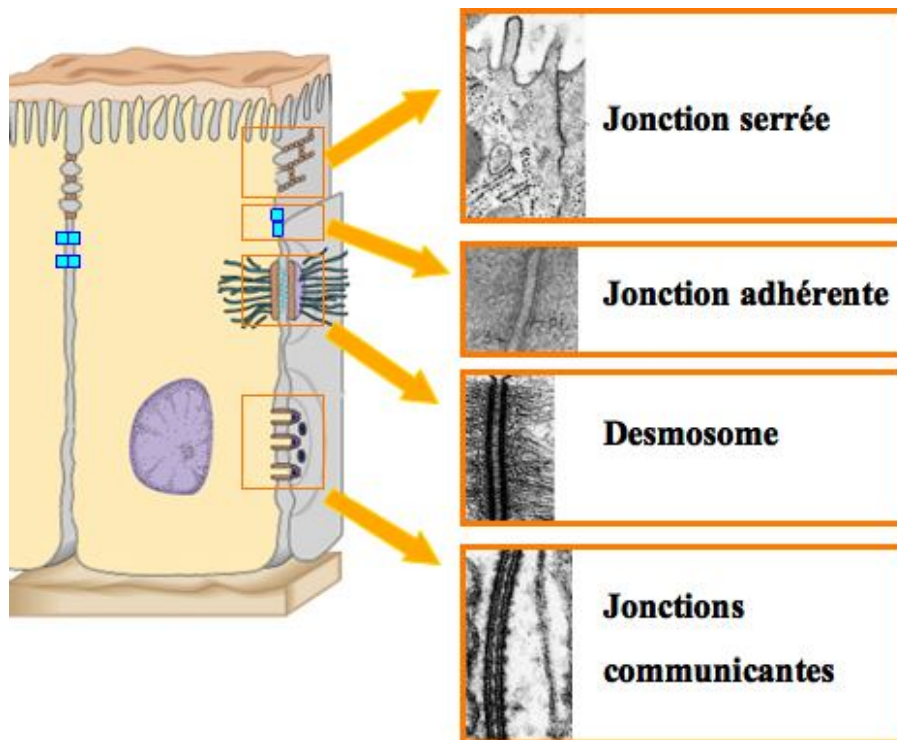


Figure 11 : Organisation des structures d'adhérence le long du contact intercellulaire.

(adapté de : <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/cells/junctions.jpg>)

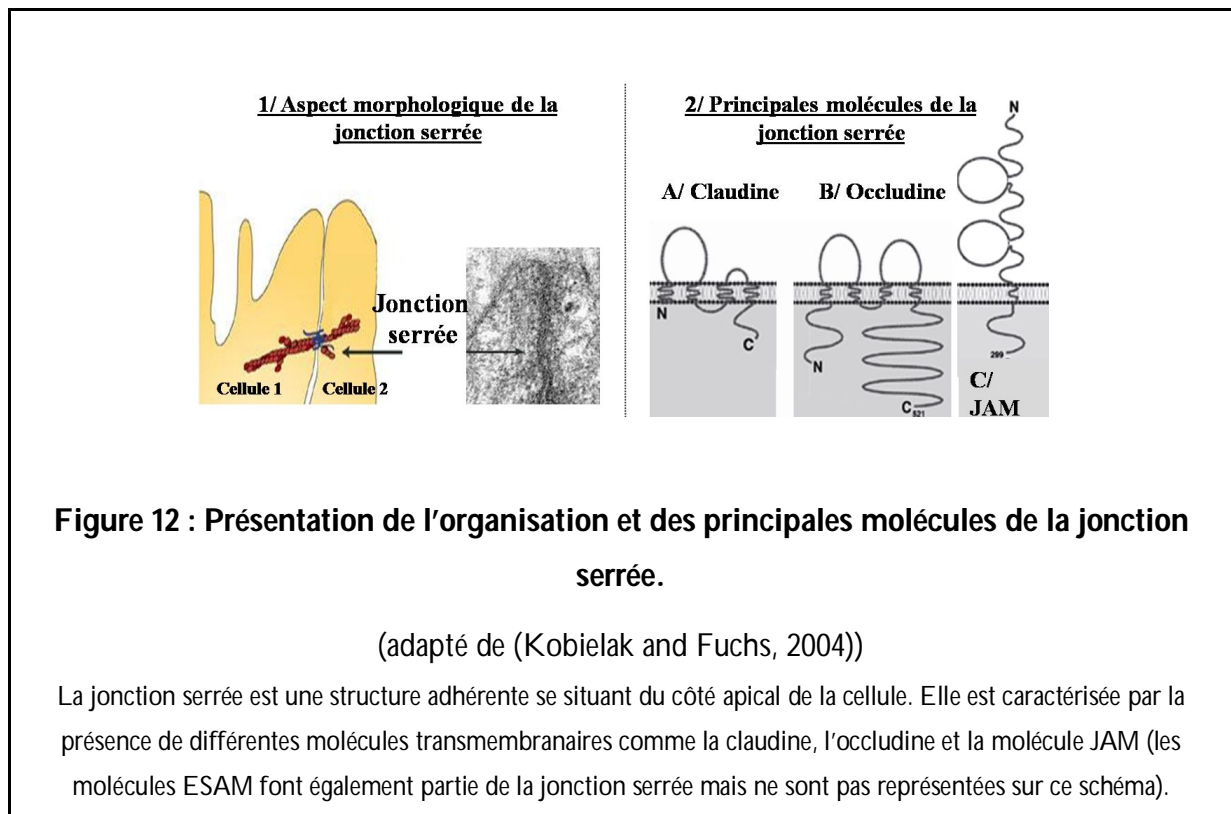
Les cellules établissent des contacts intercellulaires qui sont organisés en plateforme d'adhérence. La jonction serrée se situe du côté le plus apical des contacts intercellulaires. La jonction adhérente, le desmosome et les jonctions communicantes sont d'autres structures qui permettent le maintien de la cohésion intercellulaire.

Cette structure est suivie d'une jonction adhérente, de desmosomes répartis le long de la membrane basolatérale jusqu'au pôle basal. De plus, d'autres structures assurent des échanges entre cellules par la création de pores communicants entre cellules adjacentes : ce sont les jonctions communicantes (ou gap junction). Bien que l'endothélium présente de nombreuses similarités avec l'épithélium, l'organisation des structures jonctionnelles interendothéliales présentent une hiérarchie différente. Tout d'abord, les cellules endothéliales ne possèdent pas de desmosomes. De plus, les jonctions serrées et les jonctions adhérentes sont moins organisées et peuvent se superposer suivant le type d'endothélium étudié (Dejana et al., 2009).

B. La jonction serrée (TJ) interendothéliale

1. Présentation de la jonction serrée

La jonction serrée appelée également jonction imperméable est essentielle dans le maintien de la cohésion cellulaire. Elle empêche la diffusion de molécules présentes dans la lumière jusqu'aux tissus sous-jacents et restreint la fuite des lipides et des protéines entre le pôle apical et basolateral de la membrane plasmique (Harhaj and Antonetti, 2004). Cette structure se localise du côté apical de la membrane et peut être facilement visualisée en microscopie électronique puisqu'elle est dense aux électrons (Cf. **Figure 12**). La jonction serrée donne l'illusion d'une fusion des membranes de deux cellules voisines. Elle est principalement composée de trois différentes familles de protéines transmembranaires : les molécules de la famille des claudines incluant l'occludine, des molécules d'adhérence de la jonction (JAM, Junctional Adhesion Molecules) et les ESAM, molécules d'adhérence sélectives des cellules endothéliales (Endothelial cell-Selective Adhesion Molecules). Des protéines adaptatrices peuvent interagir avec ces protéines transmembranaires.



2. Les principales molécules de la jonction serrée

a. Les claudines

Les molécules de la famille des claudines sont les protéines majeures de la jonction serrée. Elles sont capables de former des interactions homophiliques ou hétérophiliques avec d'autres sous types de claudine. Il existe 20 claudines différentes, cependant chaque claudine est spécifique d'un tissu en particulier. Elles présentent toutes la même structure et ont des similarités structurales avec l'occludine. Deux boucles forment la région extracellulaire de la claudine. La partie extracellulaire et plus précisément sa structure tri-dimensionnelle régule le passage des solutés au travers de la monocouche de cellules. La région extracellulaire est suivie d'une région transmembranaire et d'une queue cytoplasmique qui permet la liaison avec des partenaires protéiques comme les protéines ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Zonula Occludens), MUPP1 (Multi-PDZ Protein 1), PATJ (PALS1-associated TJ protein).

Au sein de l'endothélium, les structures jonctionnelles à base de claudine régulent le mouvement d'ions paracellulaires (Wallez and Huber, 2008). La claudine la plus abondante dans l'endothélium est la claudine-5. Elle est présente de manière ubiquitaire le long de l'arbre vasculaire, bien que plus exprimée au sein des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Sa fonction a été mise en évidence par des expériences d'inactivation génique chez la souris. Les souris déficientes se développent normalement mais meurent peu de temps après leur naissance. De manière surprenante, la déficience en claudine-5 ne modifie pas la structure des jonctions serrées, qui, cependant, deviennent plus perméables pour des petites molécules (Nitta et al., 2003). Très récemment, il a été mis en évidence que l'endothélium pouvait exprimer d'autres claudines comme les claudine-1, -3 (Neuhaus et al., 2008), -11 (Wessells et al., 2009), et -12 (Belanger et al., 2007).

b. L'occludine

La molécule d'occludine est historiquement la première protéine mise en évidence au sein des jonctions serrées. Cette protéine possède quatre domaines transmembranaires qui forment deux boucles extracellulaires de taille similaire. La première boucle est impliquée dans l'adhérence intercellulaire alors que la deuxième est responsable de la résistance électrique transendothéliale. Trois domaines cytoplasmiques terminent la molécule. La partie intracellulaire est remarquablement conservée entre les espèces et interagit avec des partenaires cytoplasmiques comme la protéine ZO-1 ce qui lui permet d'être reliée au cytosquelette d'actine. Elle interagit également avec les protéines ZO -2 et -3 ainsi qu'avec une molécule des jonctions

communicantes, la connexine-32. L'occludine s'associe à d'autres protéines intracellulaires des jonctions adhérentes comme VAP-33 (pour VAMP associated protein) (Lapierre et al., 1999). Cette protéine serait capable de réguler la localisation de l'occludine. La technique de double hybride a pu mettre en lumière d'autres partenaires potentiels cytoplasmiques de la molécule d'occludine comme la PKC- ζ (Protéine Kinase C- ζ), la tyrosine kinase c-YES et la protéine p85 (Nusrat et al., 2000a). L'occludine n'est pas essentielle à la formation de la jonction serrée mais renforce la cohésion intercellulaire. En effet, les souris déficientes pour cette protéine présentent des jonctions serrées correctement formées (Saitou et al., 2000). Cependant, ces souris montrent un retard de croissance postnatale et présentent de nombreuses anomalies au sein de plusieurs tissus (inflammation, calcification du cerveau, atrophies testiculaires). D'autres protéines de la jonction serrée seraient alors capables de compenser l'absence d'occludine. Chez l'homme, la perte d'expression de l'occludine est associée à plusieurs pathologies. Une dissociation de la barrière hémato-encéphalique est alors remarquée, ce qui prouve que l'occludine augmente la force d'interaction entre les cellules endothéliales.

c. Les protéines JAM

Les molécules d'adhérence jonctionnelles (JAM, Junction Adherent Molecules) sont des protéines appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Le domaine extracellulaire est formé de deux boucles de type immunoglobuline, suivi d'un passage transmembranaire. Leur domaine intracellulaire leur permet d'interagir avec différentes protéines telles que ZO-1, AF-6 et ASIP (Agouti Signaling Protein). Ce sont des protéines localisées à la jonction intercellulaire des cellules endothéliales mais également de certains épithelia polarisés. Les cellules circulantes comme les leucocytes et les plaquettes expriment également cette molécule.

3 types de JAM existent : JAM-A, -B et -C (Bazzoni, 2003)).

JAM-A se localise à proximité des jonctions serrées. Cette protéine est exprimée à la surface des cellules endothéliales, des plaquettes et des cellules du système immunitaire (neutrophiles, monocytes et lymphocytes).

JAM-C présente également une expression variée au sein du système vasculaire : elle est présente sur les cellules endothéliales vasculaires, les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques et également sur les plaquettes, les Natural Killer (NK) et les cellules dendritiques.

JAM-B a une distribution plus restreinte puisque présente uniquement sur certains types de vaisseaux. En effet, elle se localise à la jonction des cellules endothéliales de différents vaisseaux. Elle est néanmoins surtout exprimée au sein des cellules endothéliales qui constituent les veinules à haut endothelium ou HEV (High Endothelial Venules). Ces veinules post-capillaires sont le lieu de passage des cellules lymphoïdes de la circulation vers le système lymphoïde et les tissus.

Les molécules JAM exercent des interactions homophiliques, mais peuvent s'associer à d'autres protéines, notamment les intégrines présentes à la surface des cellules du système immunitaire comme les leucocytes. Ainsi, JAM-A permet l'adhésion du leucocyte sur la cellule endothéliale et facilite ainsi la transmigration leucocytaire. De plus, les protéines JAM sont également capables d'induire l'activation plaquettaire en les immobilisant à la surface des cellules endothéliales stimulées par des agents pro-inflammatoires.

d. La molécule ESAM

La molécule ESAM est une protéine qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Cette protéine engendre des liaisons de type homophile et calcium dépendante entre cellules endothéliales voisines. Elle est uniquement exprimée dans l'endothelium vasculaire et dans les plaquettes activées.

Son rôle pendant le développement vasculaire présente quelques contradictions. En effet, bien que cette molécule d'adhérence ne soit pas essentielle à la formation des vaisseaux chez les souris déficientes en ESAM puisqu'elles présentaient une vasculature comparable aux souris sauvages, *in vitro*, les cellules endothéliales issues des souris déficientes en ESAM n'étaient pas capables de s'organiser en tube sur une matrice de matrigel (Ishida et al., 2003).

Néanmoins, dans un contexte tumoral *in vivo*, cette protéine semble être importante pour la formation de vaisseaux tumoraux. Les tumeurs induites dans des souris déficientes en ESAM sont moins vascularisées que les tumeurs implantées chez des souris sauvages. Ce phénomène s'explique par une mauvaise stabilisation des contacts cellulaires et une mauvaise cohésion des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales ESAM $-/-$ ont de grandes difficultés à migrer en présence de sérum ou en présence de FGF.

Enfin, il a été montré que ESAM joue un rôle dans l'extravasation précoce et spécifique des neutrophiles à travers la barrière endothéliale (Wegmann et al., 2006)).

C. Molécules d'adhérence n'appartenant pas à une structure jonctionnelle particulière

Bien que certaines protéines soient concentrées au niveau des contacts interendothéliaux, ces protéines ne sont pas considérées comme appartenant à une structure jonctionnelle particulière. La protéine PECAM et la protéine S-endo-1 sont deux protéines illustrant parfaitement ces observations.

1. PECAM

a. Structure moléculaire de PECAM

PECAM, également appelée CD31, est une molécule d'adhérence transmembranaire de 130 kDa appartenant également à la superfamille des immunoglobulines. Au cours du développement, PECAM est exprimée à des stades précoces dans le blastocyste, dans les angioblastes et dans les îlots sanguins du sac vitellin. Son expression persiste tout au long du développement embryonnaire. Chez l'adulte, PECAM est principalement exprimée par les cellules endothéliales. Cette protéine constitue donc un excellent marqueur protéique des cellules endothéliales. Cependant, elle est également exprimée sur d'autres types cellulaires comme les leucocytes et les plaquettes (Newman and Newman, 2003). PECAM est localisée au niveau des contacts intercellulaires mais également au niveau du pôle apical de la cellule. Cette molécule peut s'engager aussi bien dans des interactions homophiliques entre cellules endothéliales voisines grâce à son domaine extracellulaire que dans des interactions hétérophiliques avec l'intégrine $\alpha v \beta 3$, la molécule CD38 (ADP ribose nuclease) et la protéine CD177 (NB-1), exprimée par un sous-type de leucocyte. Grâce à un mécanisme d'épissage alternatif, différentes isoformes de PECAM existent. Chez l'homme, l'isoforme majoritaire est représentée par la forme entière alors que chez la souris la forme tronquée pour l'exon 14 et 15 est la forme majoritaire. Ces isoformes possèdent des propriétés adhésives différentes (Sheibani et al., 1999) et pourraient présenter des fonctions spécifiques au cours du développement vasculaire. En effet, il a été montré qu'il existe une expression différentielle des diverses isoformes au cours de l'organisation du réseau vasculaire (Wang et al., 2003).

PECAM est capable de transmettre des signaux intracellulaires qui sont principalement régulés par son domaine cytoplasmique contenant deux motifs ITIMS (Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motifs). Chaque ITIM porte un résidu tyrosine pouvant être phosphorylé (Biswas et al., 2003). Ces motifs sont des points d'ancrage pour diverses molécules signalétiques

comme des tyrosines phosphatases SHP-1 ou SHP-2 (Src Homology Phosphatase 1, Src Homology Phosphatase 2). Elle interagit également avec les caténines : la β - et la γ -caténine (**Cf. Figure 13**).

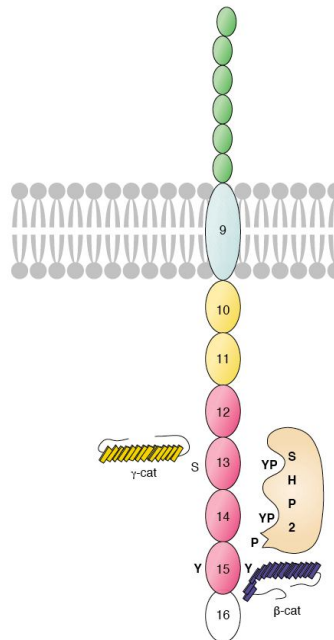


Figure 13 : Représentation schématique de la structure de la protéine PECAM.

(D'après (Ilan and Madri, 2003))

Le domaine extracellulaire (en vert) est formé de 6 domaines de type Ig répétés.

Le domaine intracellulaire (en rose) est formé généralement de 7 motifs (10 à 16), qui correspondent aux différents exons du gène. Les domaines 13 et 14 contiennent les domaines ITIM qui une fois phosphorylés interagissent avec SHP-2. L'exon 15 code le domaine de liaison à la β -caténine phosphorylée et l'exon 13, celui responsable de la liaison à la γ -caténine.

b PECAM et ses partenaires cytoplasmiques

◆ β -caténine et SHP-2

À la suite d'un traitement au VEGF, la forme phosphorylée de la β -caténine est capable d'interagir avec le domaine intracellulaire de PECAM. PECAM constituerait ainsi un réservoir de β -caténine phosphorylée (Ilan et al., 1999). Ceci pourrait alors éviter la dégradation de la β -caténine par le protéasome ou bien la translocation de la caténine dans le noyau, lieu où elle exerce son rôle de co-facteur de transcription (voir session « β -caténine » page 30 de la partie D, 2, b). L'interaction entre PECAM et la β -caténine peut être régulée par la phosphatase SHP-2. En

effet, le domaine de liaison à la β -caténine est très proche de celui de SHP-2. SHP-2 pourrait alors moduler la formation du complexe β -caténine phosphorylée/PECAM. Une fois déphosphorylée, la β -caténine libre pourrait participer à de nouvelles jonctions adhérentes (Biswas et al., 2006).

◆ γ -caténine

PECAM peut également lier la γ -caténine. L'interaction est possible uniquement lorsque PECAM est phosphorylée, de préférence sur des résidus sérine ou thréonine (Ilan et al., 2000). Cette phosphorylation est effectuée via l'activation de la Protéine Kinase C (PKC). La phosphorylation induit alors un changement de localisation de la γ -caténine nucléaire, qui peut alors être transloquée du noyau vers les jonctions intercellulaires. Le recrutement de la γ -caténine permet l'interaction indirecte de PECAM avec la desmoplakine, ce qui permettrait à PECAM d'être reliée aux filaments intermédiaires comme les filaments intermédiaires de vimentine (Ilan and Madri, 2003). Ce phénomène permettrait la formation d'un lien physique entre la surface cellulaire et l'enveloppe nucléaire (Ilan et al., 2000). Également, l'interaction entre PECAM et la γ -caténine pourrait jouer un autre rôle. En effet, comme pour la β -caténine, la γ -caténine est décrite comme étant un co-facteur transcriptionnel (Maeda et al., 2004) (Shimizu et al., 2008). Ainsi, liée à PECAM, elle serait donc séquestrée par cette dernière et ne pourrait plus assurer son rôle dans l'expression génique.

c. Fonction de la protéine PECAM

◆ Rôle de PECAM dans l'angiogenèse

In vitro, plusieurs études ont mis en évidence un rôle fort de PECAM dans l'angiogenèse. En effet, les cellules déficientes en protéine PECAM ou traitées avec des anticorps dirigés spécifiquement contre PECAM perdent leur capacité à former des structures vasculaires *in vitro* (DeLisser et al., 1997) (Cao et al., 2002) (Solowiej et al., 2003) (Dimaio et al., 2008). De plus, cette molécule d'adhérence joue un rôle clé au cours de la migration des cellules endothéliales (Cao et al., 2009) (O'Brien et al., 2004). D'une part, il a été montré que PECAM, en recrutant SHP-2 à la membrane, induirait une déphosphorylation des protéines des adhérences focales comme la paxilline et la vinculine. Ces déphosphorylations déstabiliseraient et induiraient un turnover des adhérences focales (O'Brien et al., 2004). D'autre part, PECAM pourrait réguler la formation de structures membranaires propices pour la migration comme les filopodes, en régulant l'expression de la petite protéine appartenant à la famille des Rho-GTPase : Cdc42. En effet, les

cellules déficientes en PECAM ont un niveau d'expression pour Cdc42 très faible et ne présentent plus de filopodes (Cao et al., 2009).

In vivo, PECAM ne semble cependant pas jouer un rôle clé au cours du développement et pendant la formation du réseau vasculaire. Les souris déficientes en PECAM se développent normalement et leur réseau vasculaire ne présente aucune anomalie majeure (Duncan et al., 1999). Seule l'angiogenèse post-natale de la rétine nécessiterait la présence de la protéine PECAM (Dimaio et al., 2008). En absence de PECAM, les vaisseaux de la rétine sont moins nombreux, plus dilatés et ne peuvent former un réseau branché. Ce phénomène s'expliquerait par une diminution de l'endogline, molécule critique pour la néo-vascularisation de la rétine (résultats non publiés par l'équipe de Shebani). Ce résultat suggère que PECAM pourrait réguler l'expression de certains gènes.

◆ Importance de PECAM dans la transmigration leucocytaire

PECAM au sein de la cellule endothéliale est surtout connue pour aider et favoriser la transmigration leucocytaire à travers la monocouche de cellules endothéliales (Garrido-Urbani et al., 2008). La liaison de la protéine PECAM de la cellule immunitaire avec la protéine PECAM endothéliale génère une interaction aboutissant à une coopération entre les deux types cellulaires qui permet alors la transmigration leucocytaire. Le domaine 1 du domaine extracellulaire de PECAM est le domaine protéique qui permet l'interaction entre les deux types cellulaires et la transmigration leucocytaire. En effet, la protéine PECAM soluble comprenant uniquement le premier domaine de type immunoglobuline provoque un blocage de la diapédèse des leucocytes et ceci aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Liao et al., 1997). De plus, le traitement avec un anticorps dirigé spécifiquement contre ce domaine induit une agrégation des leucocytes au niveau de la surface luminale de la cellule endothéliale (Nakada et al., 2000).

Une fois ce premier contact formé entre la cellule endothéliale et le leucocyte, l'engagement de la protéine PECAM exprimée à la surface de la cellule endothéliale avec celle de la cellule leucocytaire induit chez le leucocyte la translocation de l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ du cytoplasme vers la membrane plasmique (Dangerfield et al., 2002) (Wang et al., 2005). Ce mécanisme permet de renforcer l'adhérence entre les deux types cellulaires et donc le passage du leucocyte.

Enfin, lorsque le leucocyte s'engage dans le processus de transmigration, PECAM favoriserait alors le passage du leucocyte à travers la membrane basale (Liao et al., 1995) (Wakelin et al., 1996)).

Cependant, au fil des études, il s'est avéré que la régulation de la transmigration leucocytaire par PECAM était beaucoup plus complexe. En effet, en fonction du stimulus appliqué mais

également en fonction du fond génétique des souris étudiées, la migration des leucocytes pouvait être différente (Woodfin et al., 2007b). Une si grande variation pourrait s'expliquer par le fait que PECAM n'est pas la seule molécule d'adhérence impliquée dans la transmigration leucocytaire. *In vivo*, les protéines ICAM-2 et JAM-A favorisent la transmigration leucocytaire indépendamment de PECAM (Huang et al., 2006) (Woodfin et al., 2007a) (Woodfin et al., 2009). Ces études démontrent donc que PECAM est, certes, impliquée dans la transmigration leucocytaire mais non essentielle au cours de ce processus.

2. S-endo-1 (ou CD146 ou Muc 18) : structure et fonction

Cette molécule d'adhérence appartient à la superfamille des immunoglobulines et a été découverte au sein de cellules de mélanome (Shih, 1999). Elle est exprimée dans les cellules musculaires lisses et dans les cellules endothéliales. S-endo-1 est localisée au niveau des contacts intercellulaires (Bardin et al., 2001) et s'engage dans des interactions homophiliques. S-endo-1 est une molécule importante pour l'adhérence interendothéliale (Solovey et al., 2001) et semble être impliquée au cours de l'angiogenèse (Yan et al., 2003). En effet, elle aurait un rôle dans l'activation de la signalisation pro-angiogénique et constituerait un véritable récepteur membranaire du signal au cours de l'angiogenèse tumorale. En réponse aux stimuli des cellules tumorales, S-endo 1 induit l'activation des protéines p38/IKK (I KappaB Kinase)/NFκB (Nuclear Factor-Kappa B) (Zheng et al., 2009). Cette voie signalétique activerait alors des gènes pro-angiogéniques comme IL-8, VEGF, ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) et la MMP-9 (Matrix MetalloProteinase-9). L'activation de CD146 pourrait engendrer une autre voie de signalisation faisant intervenir le recrutement de Fyn qui est une kinase appartenant à la famille Src. Cette activation induirait une phosphorylation de la Focal Adhesion Kinase (ou FAK) et de la paxilline, principales protéines des adhérences focales.

D. La jonction adhérente

1. Généralités

Les jonctions adhérentes forment des ceintures d'adhérence au pôle apical des cellules assurant un ancrage fort des cellules entre elles ainsi qu'au cytosquelette d'actine. Ces jonctions, non seulement renforcent la cohésion mécanique des tissus, mais permettent également la contraction d'un anneau d'actine apical à l'origine de nombreux mouvements morphologiques au cours de l'embryogenèse. Les molécules clés de la jonction adhérente sont représentées par des molécules de la famille des cadhérines. Un chapitre complet est donc dédié à la description de ces molécules.

Les cadhérines constituent une large famille de glycoprotéines localisées à la surface des cellules. La plupart d'entre elles participent à des adhérences dépendantes du calcium. Elles jouent un rôle clé dans la formation des tissus solides (Takeichi, 1995) (Tepass, 1999) et leur expression sélective est finement régulée au cours du développement embryonnaire (Radice et al., 1997) (Stepniak et al., 2009). De plus, leur fonction adhésive est sélective. En effet, lorsque différents types de cellules sont mélangés, les cellules de même type sont capables de s'assembler. Ces interactions sont dites homotypiques. Cette association cellulaire se fait en fonction du sous-type de cadhérine qu'elles expriment. Les cellules forment ainsi des liaisons homophiliques (Takeichi, 1990). Chez les vertébrés, les cadhérines sont au nombre de 100, divisées en sous-familles. La partie extracellulaire d'une cadhérine est caractérisée par la présence de plusieurs domaines répétés d'environ cent dix acides aminés. Ce motif, nommé ectodomaine (ou EC), se présente sous la forme d'un module de type immunoglobuline et peut être répété entre cinq et trente fois. Une protéine est désignée comme cadhérine si elle possède ce module. La superfamille des cadhérines se compose donc de diverses protéines structurellement différentes. Nollet et collaborateurs ont proposé de classer les cadhérines en six sous-familles. Ce classement se base sur l'analyse phylogénique de la séquence du domaine EC1. Parmi toutes les cadhérines, ce domaine est très conservé (Nollet et al., 2000). Les six sous-familles de cadhérines (**Cf. Figure 14**) sont les cadhérines classiques (de type I ou II), les cadhérines desmosomales, les protocadhérines, les cadhérines à ancre GPI (pour glycosyl-phosphatidylinositol), les cadhérines de type Flamingo et les FAT cadhérines.

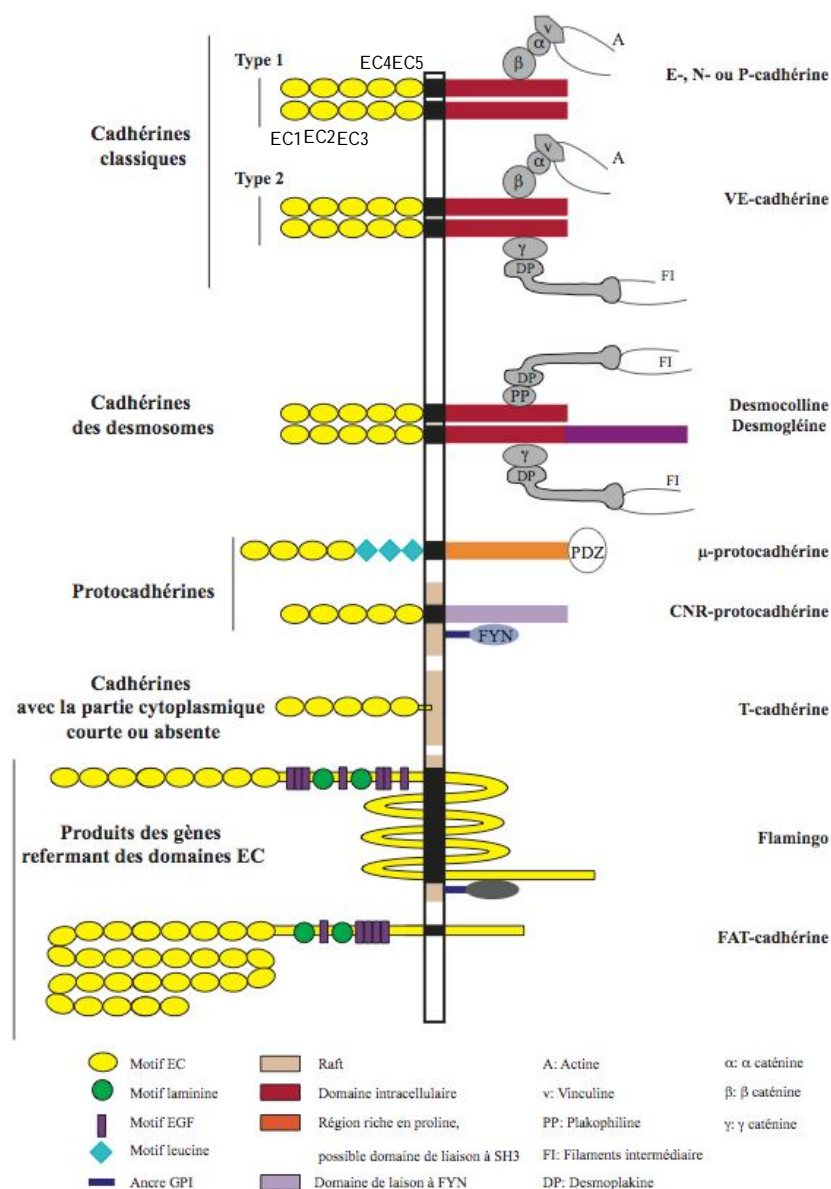


Figure 14 : Schéma représentatif des membres de la superfamille des cadhérines

(D'après (Angst et al., 2001))

Les six sous-familles appartenant à la super famille des cadhérines sont représentées.

Les cadhérines classiques se divisent en deux sous types : le type I et le type II. Elles sont reliées au cytosquelette d'actine par des partenaires cytoplasmiques et peuvent être également reliées aux filaments intermédiaires. Elles présentent 5 domaines répétés de type cadhérine (EC1 à 5). La cadhérine desmosomale présente des similarités avec la cadhérine classique et est connectée aux filaments intermédiaires. Les protocadhérines ne possèdent pas d'interaction avec le cytosquelette. Certaines cadhérines peuvent être enchâssées aux radeaux lipidiques comme les cadhérines dépourvue de partie cytoplasmique. Les cadhérines Flamingo et les cadhérines FAT possèdent de nombreux domaines extracellulaires répétés (EC) ainsi que des motifs EGF et laminine.

2. Les cadhérines classiques

Les cadhérines classiques sont les cadhérines les plus étudiées. La séquence peptidique du domaine EC1 a permis de les classer en deux sous-types. Les principales cadhérines classiques de types I sont représentées par les E-, N- et P-cadhérines. La VE-cadhérine est une cadhérine de type II.

a. Organisation moléculaire et assemblage homophilique

Les cadhérines classiques sont formées d'un domaine extracellulaire composé de 5 domaines EC (**Cf. Figure 15**). Ce domaine possède des sites de liaison au calcium ce qui stabilise la cadhérine et permet l'interaction entre les molécules de cadhérines. Le domaine extracellulaire est suivi d'un domaine transmembranaire à un seul passage qui est lui-même suivi d'un domaine intracellulaire. Le domaine intracellulaire interagit avec diverses protéines. Les partenaires protéiques préférentiels de ce domaine sont les caténines, ce qui permet aux cadhérines d'être liées au cytosquelette d'actine.

Le domaine EC1 est le principal domaine responsable de la capacité adhésive des molécules de cadhérine. Toutes les cadhérines de type I comportent au sein de leur domaine EC1 en position C-terminal une séquence tripeptidique conservée : Histidine-Alanine-Valine (HAV). Cette séquence a longtemps été considérée comme la zone moléculaire de la cadhérine permettant l'adhérence cellulaire (Blaschuk et al., 1990). Les cadhérines de type II, comme par exemple la VE-cadhérine, ne possèdent pas cette séquence, puisqu'elle diffère d'un acide aminé (Vincent et al., 2004). De plus, le module EC1 possède un résidu tryptophane-2 (Trp-2) qui va pouvoir se loger dans la poche hydrophobe portée par le module EC1 de la molécule de cadhérine adjacente. De cette manière, la liaison homophilique peut être créée (Shapiro et al., 1995) (Tamura et al., 1998) (Boggon et al., 2002) (Shapiro and Weis, 2009). Ce modèle nommé « strad-swap » (pour « échange de brin ») représente le modèle d'interaction entre deux molécules de cadhérine le mieux décrit. Les cadhérines de type II présentent également ce même type d'interaction mais possèdent un résidu tryptophane additionnel appelé Trp-4, qui s'insère dans une autre poche hydrophobe portée par le domaine EC1 de la molécule de cadhérine adjacente (Patel et al., 2006). L'interaction entre les domaines EC1 de deux molécules de cadhérine voisine est de faible affinité et se forme au début du contact intermoléculaire (Sivasankar et al., 2001). La présence ou non d'ions calcium régit l'interaction soit en *trans* (entre deux domaines extracellulaires de deux cellules adjacentes) ou soit en *cis* (entre deux domaines extracellulaires d'une même cellule) (Shapiro and Weis, 2009). En effet, en absence de calcium, les ectodomaines de cadhérines d'une même cellule perdent leur rigidité et peuvent s'associer entre eux (Pokutta et al., 1994) (Chitaev and Troyanovsky, 1998). A contrario, lorsque le calcium est fixé à son domaine de liaison, cette

interaction induit une modification de la courbure de la cadhérine ce qui facilite l'interaction de la cadhérine avec la cadhérine voisine (Boggon et al., 2002).

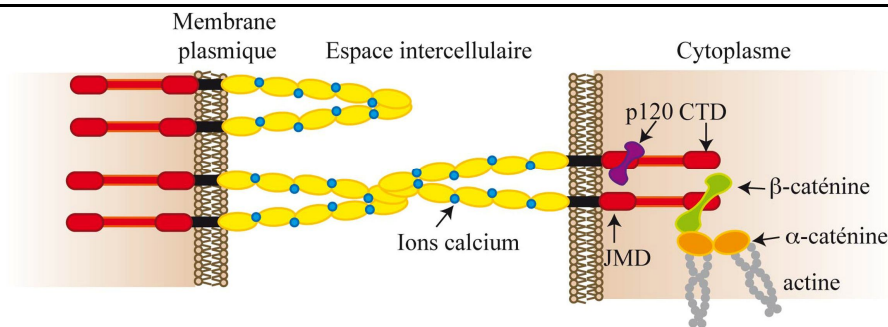


Figure 15 : Représentation schématique d'une cadhérine classique au niveau d'une jonction adhérente

(D'après (Paredes et al., 2007))

Les cadhérines classiques possèdent un domaine extracellulaire formé de 5 domaines répétés de type cadhérine. Chaque domaine possède un site de liaison au calcium (en bleu). Le domaine transmembranaire à un seul passage permet aux cadhérines d'être enchassées à la membrane. Le domaine cytoplasmique permet la liaison aux caténines. p120 interagit avec les cadhérines classiques grâce au domaine JMD (Juxta Membrane Domain). La β-caténine se lie au domaine CTD (C-Terminal binding Domain). La γ-caténine (non représentée) se lie également au domaine CTD et permet de relier la cadhérine aux filaments intermédiaires. L'α-caténine permet de relier la cadhérine au cytosquelette d'actine. Les cadhérines établissent des interactions en cis au niveau de deux dimères grâce au domaine EC1 et aux ions calcium. Ces dimères par la suite peuvent s'associer tête-bêche.

Les cadhérines, assemblées entre elles, forment ensuite des structures « zippées » le long de la jonction adhérente (Shapiro et al., 1995) (Nose et al., 1988) (Chen et al., 2005) (Patel et al., 2006). Bien que les cadhérines assurent essentiellement des interactions homophiliques, certaines cadhérines classiques peuvent interagir avec d'autres types de molécules mais cette capacité reste exceptionnelle. La E-cadhérine, par exemple, peut se lier aux intégrines $\alpha E\beta 7$ et $\alpha 2\beta 1$ (Cepek et al., 1994) (Takeichi, 1995). La N-cadhérine peut interagir avec le récepteur au FGF (Williams et al., 1994).

b. Les caténines : partenaires cytoplasmiques des cadhérines classiques

La région cytoplasmique des cadhérines permet l'interaction à des partenaires préférentiels comme les caténines. La β - et γ -caténine sont en interaction directe avec la cadhérine (**Cf. Figure 15**). Elles se lient au niveau de la région C-terminale du domaine cytoplasmique appelée pour cela CTD (C-terminal domain). L' α -caténine se lie à la β -caténine et l'ensemble du complexe est relié au cytosquelette d'actine. Ce complexe ancre la cadhérine de manière stable à la membrane. Cependant, l'association du cytosquelette d'actine au complexe cadhérine/ β -caténine/ α -caténine est depuis peu remis en question. En effet, des études ont montré que l' α -caténine ne peut pas être associée simultanément au cytosquelette d'actine et à la β -caténine (Gates and Peifer, 2005) (Yamada et al., 2005) (Pokutta et al., 2008), ce qui impliquerait la participation de molécules adaptatrices entre l' α -caténine et l'actine. Récemment, il a été proposé que l'eplin pourrait jouer ce rôle et constituer un lien entre l' α -caténine et l'actine (Abe and Takeichi, 2008).

La région la plus proximale du domaine cytoplasmique lie la caténine p120 au niveau d'une région appelée JMD (juxta membrane domain).

♦ La β -caténine

La β -caténine est une caténine très conservée au cours de l'évolution et se compose de 12 motifs répétés de types Armadillo (Peifer et al., 1992). Cette caténine possède une structure en superhélice formée d'une compaction de domaines répétés de type arm (pour armadillo). La β -caténine présente une caractéristique intéressante puisqu'elle peut être transloquée des jonctions vers le noyau où elle pourra alors s'associer à des facteurs de transcription et réguler ainsi l'expression de gènes cibles. Ainsi, l'association de la β -caténine aux cadhérines classiques permet de réguler le pool de β -caténine libre ce qui constitue donc un moyen de réguler l'expression génique. Plus précisément, la β -caténine peut réguler l'expression de certains gènes puisqu'elle est une molécule clé dans la voie de signalisation Wnt. Les molécules Wnt sont des facteurs de croissance et de différenciation fondamentaux au cours du développement embryonnaire. Ces protéines sont des glycoprotéines sécrétées qui se lient aux récepteurs transmembranaires frizzled (Fz). En absence de signal Wnt, la β -caténine cytosolique est phosphorylée sur sérine et thréonine par le complexe protéique constitué de la Glycogene Synthase Kinase (GSK) et de l'Adenomatous Polyposis Coli (APC). La β -caténine, alors phosphorylée, est rapidement polyubiquitinylée et dégradée. En revanche, l'association de certains Wnts à leurs récepteurs

frizzled inhibe le complexe de phosphorylation contenant la GSK. De cette manière, la β -caténine n'est plus dégradée et s'accumule alors dans le cytoplasme. La β -caténine libre peut se délocaliser vers le noyau et lier les facteurs de transcription de la famille T-Cell Factor (TCF)/Lymphocyte Enhancing Factor (LEF). Ce phénomène entraîne la transcription de nombreux gènes impliqués dans divers processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation (Porfiri et al., 1997) (**Cf. Figure 16**). Chez l'adulte, cette voie de signalisation peut être de nouveau activée et conduit à la progression tumorale.

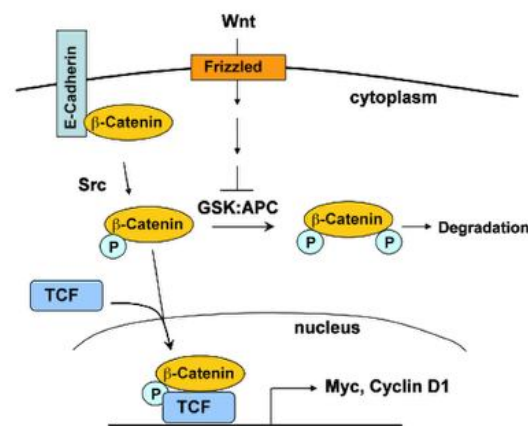


Figure 16 : Signalisation Wnt : rôle de la β -caténine

(D'après (Porfiri et al., 1997))

La β -caténine est une molécule régulatrice de la voie de signalisation Wnt. Ainsi, elle peut être séquestrée par la cadhérine, ou elle peut être hyper phosphorylée et ensuite dégradée. Le pool de β -caténine libre peut être transloqué dans le noyau où elle s'associe avec le facteur de transcription TCF. Ce complexe induit la transcription de gènes impliqués dans le cycle cellulaire comme myc et la cycline D.

Contrairement au rôle clé de la β -caténine dans la voie Wnt des cellules épithéliales, le rôle de la β -caténine des cellules endothéliales dans cette voie de signalisation est beaucoup moins clair et moins décrit. Quelques études ont cependant mis en évidence son rôle dans la prolifération de la cellule endothéliale. La surexpression de Wnt-1 induit une augmentation de la prolifération cellulaire (Wright et al., 1999). La VE-cadhérine comme la E-cadhérine servirait donc de réservoir à β -caténine et la séquestration de la caténine régulerait ainsi l'activité proliférative de la cellule endothéliale.

Dans les cellules endothéliales, une autre fonction spécifique est attribuée à la β -caténine et plus précisément au niveau de la stabilisation du complexe à base de VE-cadhérine à la membrane. L'interaction entre la β -caténine et la VE-cadhérine renforce le contact interendothélial puisque la disjonction des deux molécules suite à la phosphorylation du

complexe à base de VE-cadhérine, aboutit à des perturbations des interactions intercellulaires (Lilien and Balsamo, 2005). Le contrôle de cette phosphorylation par des phosphatases comme SHP-2 permettrait le maintien du complexe VE-cadhérine/ β -caténine (Ukropec et al., 2000).

◆ La γ -caténine

La structure de la γ -caténine est très proche de celle de la β -caténine. Elle permet, grâce à la desmoplakine, de relier les cadhérines aux filaments intermédiaires. Le rôle exact de la γ -caténine est encore à l'heure actuelle incertain. Elle serait cependant, comme la β -caténine, impliquée dans la régulation de la prolifération et assurerait ainsi un rôle de co-facteur transcriptionnel (Barker and Clevers, 2000) (Maeda et al., 2004) (Shimizu et al., 2008).

La fonction précise de la γ -caténine endothéliale n'a pas encore été mise en évidence. L'association de la VE-cadhérine à la γ -caténine induirait des contacts intercellulaires moins stables que ceux générés par la β -caténine (Shasby et al., 2002). Son rôle transcriptionnel au sein de la cellule endothéliale reste encore inconnu. Beaucoup de choses sont encore à découvrir concernant cette caténine au sein de la cellule endothéliale.

◆ p120

Tout d'abord décrite comme étant un substrat de la tyrosine kinase Src, la caténine p120 a été par la suite décrite comme partenaire cytoplasmique pouvant s'associer au domaine JMD des cadhérines. Le rôle majeur de p120 dans le complexe protéique à base de cadhérine, est de maintenir la stabilité et la localisation membranaire des cadhérines (Ireton et al., 2002) (Davis et al., 2003) (Xiao et al., 2003). En effet, en absence de p120, la plupart des cadhérines sont internalisées puis dégradées. Notamment, dans des cellules épithéliales, que p120 protégerait la E-cadhérine de la dégradation protéique en masquant le domaine de liaison pour Hakai : une E3 ubiquitine ligase (Fujita et al., 2002). Par ces mécanismes, p120 régulerait donc la demi-vie de la cadhérine à la membrane. De la même manière que les autres cadhérines, la VE-cadhérine membranaire serait stabilisée à la jonction grâce à p120. La caténine empêcherait la VE-cadhérine d'entrer dans des voies d'endocytose dépendante de la clathrine et d'être par la suite dégradée dans le lysosome (Chiasson et al., 2009) (Xiao et al., 2005) (Xiao et al., 2003).

En outre, p120 module la forme de la cellule en régulant l'activité des protéines de type Rho-GTPase comme Rho A, Rac1 et Cdc42 (Anastasiadis, 2007). Ces trois protéines sont importantes dans la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine. La VE-cadhérine régulerait ainsi cette fonction associée à p120, en séquestrant cette caténine.

p120 permet également l'association des cadhérines aux microtubules. Bien que cette association soit beaucoup moins connue et caractérisée que l'association des cadhérines au cytosquelette d'actine, elle permettrait de stabiliser les cadhérines à la membrane (Stehbens et al., 2006) (Waterman-Storer et al., 2000). De plus, l'association de p120 aux microtubules participerait à l'organisation membranaire des cadhérines en les transportant à la membrane plasmique à l'aide de moteurs moléculaires (Chen et al., 2003) (Mary et al., 2002) (Stehbens et al., 2009).

Par ailleurs, p120 serait impliquée dans la régulation de l'expression génique et le contrôle du cycle cellulaire. Tout d'abord, p120 possède des séquences d'adressage NLS (Nuclear Location Signal) et d'export NES : (Nuclear Export Signal) et peut être donc transloquer dans le noyau. Une fois au noyau, p120 s'associe au facteur de transcription Kaiso (Daniel and Reynolds, 1999). Ce facteur de transcription a été décrit comme pouvant réguler négativement les gènes cibles induits par le couple de facteur β -caténine/TCF suite à l'activation de la voie de signalisation Wnt. Or, le site de liaison de Kaiso à l'ADN se superpose au domaine de liaison de p120. Ainsi, p120 associée au facteur Kaiso empêcherait ce dernier de s'associer à ses gènes cibles. De cette manière, p120 inhiberait donc la fonction de facteur de transcription de Kaiso et régulerait l'expression génique (Daniel, 2007). De plus, p120 participerait à la progression du cycle cellulaire. En effet, au cours de la progression du cancer colorectal, cette caténine est capable d'interférer avec le cycle cellulaire en se liant et en stabilisant la cycline E. Ce complexe induirait la prolongation de la phase S ainsi que la synthèse de centrosomes surnuméraires provoquant la polyploïdie (Chartier et al., 2007). Ces résultats montrent donc que p120 exerce un rôle actif dans la synthèse d'ADN soit en interférant avec la fonction du facteur de transcription Kaiso ou en arrêtant le cycle cellulaire suite à son action stabilisatrice envers la cycline E.

c. La E-cadhérine

La E-cadhérine est le constituant majeur des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales. Elle reste incontestablement la cadhérine classique de type I la plus étudiée au vue de son importance au cours de processus physiologiques. En effet au cours de l'embryogenèse, mais également au cours de la progression tumorale, elle participe à un mécanisme cellulaire majeur : la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, Epithelial-Mesenchymal Transition). Ce mécanisme se caractérise par un « switch » d'expression de la E-cadhérine. La baisse d'expression et la perte de la localisation jonctionnelle de cette cadhérine est associée à un changement phénotypique de la cellule épithéliale, qui présente alors des marqueurs de type mésenchymateux (Behrens et al., 1989). La cellule devient alors plus invasive. Au cours de l'EMT, la régulation négative de la E-

cadhérine s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'une autre cadhérine classique : la cadhérine neurale ou N-cadhérine.

d. La P-cadhérine

La P-cadhérine a été découverte en 1986 par l'équipe de Takeichi (Japon). L'existence de cette cadhérine a été mise en évidence dans des cellules de souris qui n'exprimaient ni la E-, ni la N-cadhérine mais qui avaient cependant la capacité de s'agréger entre elles (Nose and Takeichi, 1986). La P-cadhérine est fortement exprimée dans le placenta de souris alors que le placenta humain est dénué de cette cadhérine (Shimoyama et al., 1989). Au cours du développement embryonnaire chez la souris, elle est exprimée de manière transitoire dans différents tissus et joue un rôle dans la morphogenèse et l'implantation embryonnaire (Hirai et al., 1989a) (Hirai et al., 1989b) (Wakita et al., 1998). Elle est exprimée de manière permanente au sein de l'épiderme, le mésothélium ainsi que dans l'endothélium de la cornée (Nose and Takeichi, 1986). Chez l'homme et la souris, la P-cadhérine permet la progression de la différenciation terminale de l'épiderme. En effet, bien que co-exprimée avec la E-cadhérine dans les cellules épithéliales, elle s'observe uniquement au sein des cellules épithéliales prolifératives se situant dans la couche basale de la majorité des épithélia stratifiés de l'épiderme et des follicules pileux.

La P-cadhérine est impliquée dans le maintien de la croissance cellulaire et dans le maintien de l'état indifférencié de la cellule. En effet, son expression est altérée dans de nombreux cancers. Les premières études réalisées ont montré que des jeunes souris femelles déficientes en P-cadhérine présentaient une différenciation précoce de la glande mammaire. Elles développaient avec l'âge des hyperplasies et des dysplasies (Daniel et al., 1995). Cependant, en fonction du type de cancer considéré, le rôle de la P-cadhérine dans la progression tumorale est contradictoire. La P-cadhérine exprimée dans les cellules de mélanomes est considérée comme un agent suppresseur de tumeurs. Les mélanomes malins montrent une expression de la cadhérine fortement inhibée voir perdue (Bachmann et al., 2005) (Bauer et al., 2006) (Van Marck et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré que la fonction adhésive de la P-cadhérine empêchait la progression du mélanome malin. Des études ont montré que certaines cellules de mélanome pouvaient sécréter, sous sa forme soluble, la partie extracellulaire de la P-cadhérine. Suite à l'inhibition de cette sécrétion par stratégie anti-sens, ces cellules deviennent alors beaucoup moins invasives et perdent leur propriété migratoire (Bauer et al., 2005) (Bauer and Bosserhoff, 2006). Il semblerait donc que la forme soluble sécrétée par les cellules cancéreuses interagisse avec la P-cadhérine membranaire ce qui modifierait l'interaction cellule-cellule.

A contrario, la P-cadhérine constitue un indicateur fiable de mauvais pronostic chez des patientes atteintes de cancer du sein (Paredes et al., 2005). En effet, cette cadhérine est

surexprimée dans ce type de cancer et est suffisante pour induire un phénotype migratoire et invasif à la cellule. Cette capacité invasive s'explique par une surexpression de facteurs pro-invasifs comme les métalloprotéases MMP-1 et -2 (Matrix MetalloProteinases) (Ribeiro et al.). MMP-1 est connue pour dégrader la matrice extracellulaire, et facilite l'invasion tumorale et la formation de foyer métastatique. Également, MMP-1 et 2 sont capables de cliver la P-cadhérine ce qui corrèle avec l'augmentation de la capacité invasive de la cellule tumorale (Ribeiro et al.).

e. La N-cadhérine

♦ Généralités et localisation

La N-cadhérine (ou cadhérine-2) a été découverte dans les tissus neuronaux en 1982 (Lagunowich and Grunwald, 1989). Elle n'est pas exclusivement neuronale car elle est également exprimée dans des cellules qui ont une origine mésodermique (muscle, endothelium). Elle se localise préférentiellement au niveau des jonctions adhérentes. Cependant, au sein des cellules endothéliales, sa localisation est originale, car elle est présente de manière diffuse autour de la membrane. Cette localisation inédite pour une cadhérine, pourrait lui valoir des fonctions spécifiques au sein des cellules endothéliales.

La N-cadhérine est fondamentale au cours du développement embryonnaire, notamment au cours du développement cardiaque. Les souris déficientes en N-cadhérine meurent à 10 jours de gestation à cause de défauts cardiaques majeurs (Radice et al., 1997). En effet, le tube cardiaque est désorganisé. Cette observation s'expliquerait par un défaut d'adhérence des myocytes cardiaques. De plus, les tubes neuronaux et les somites de ces embryons présentent des malformations et l'organisation épithéliale des somites est perturbée. Cependant tous les tissus susceptibles d'être formés à ce stade de développement sont présents et semblent être normalement différenciés.

◆ La N-cadhérine et la formation de la jonction adhérente

Grâce à leurs fonctions adhésives, les molécules de N-cadhérine s'associent entre elles et forment ainsi la jonction adhérente. Cette étape est cruciale pour le maintien des contacts intercellulaires et donc pour le maintien de l'intégrité des tissus (voir page 43 : N-cadhérine : généralités et localisation). La formation de la jonction adhérente à base de molécules de N-cadhérine a été particulièrement étudiée et permet de proposer un modèle mécanistique des différentes étapes de la synthèse protéique des cadhérines jusqu'à la formation de la jonction adhérente.

Pour qu'une jonction se forme, il faut tout d'abord que la molécule de N-cadhérine néosynthétisée à la sortie de l'appareil de golgi atteigne la membrane. Plusieurs études ont montré l'importance des microtubules dans le trafic post-golgi de la N-cadhérine (Mary et al., 2002). Le long des microtubules, la N-cadhérine est dirigée vers la membrane à l'aide de moteurs moléculaires de type kinésine (Teng et al., 2005). Ce trafic dépend de l'interaction de la N-cadhérine avec p120 qui est un adaptateur moléculaire pour la liaison de la cadhérine à la kinésine (Yanagisawa et al., 2004) (Chen et al., 2003) (**Cf. Figure 17**).

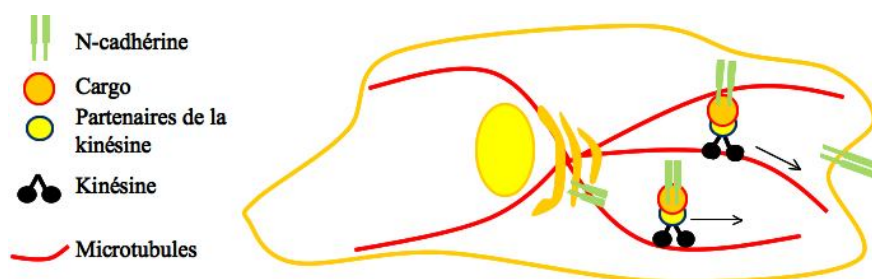


Figure 17 : Représentation schématique de l'export de la N-cadhérine à la membrane

(D'après (Mary et al., 2002))

Les molécules de N-cadhérines néo-synthétisées sont exportées depuis le golgi jusqu'à la membrane par un complexe protéique d'export guidé par les microtubules. Pour se faire, la N-cadhérine est associée à des partenaires comme p120 qui permet la liaison de la cadhérine au moteur moléculaire de type kinésine. La kinésine permet alors au complexe de se déplacer le long des microtubules.

Une fois à la membrane, les molécules de N-cadhérine peuvent diffuser librement le long de la membrane jusqu'au moment où elles rencontrent des molécules de N-cadhérine de cellules voisines et forment ainsi les premières interactions homophiliques. Cette liaison s'accompagne d'un énorme bouleversement de l'organisation de la membrane (Lambert et al., 2000) (Mege et

al., 2006). Ce phénomène corrèle à la fois avec une modification de la composition du complexe protéique à base de N-cadhérine et un remodelage différentiel du réseau d'actine. Les mécanismes moléculaires régissant ces modifications commencent à être bien décrits. Tout d'abord, la N-cadhérine associée à p120 et liée au cytosquelette d'actine, permet le remodelage profond du cytosquelette d'actine. Ce complexe induit notamment des voies de signalisation aboutissant à l'activation de la PI3K et Rac-1 qui, en guise de réponse, activent à leur tour Arp2/3 (Gavard et al., 2004) permettant alors la nucléation soutenue de l'actine. En parallèle, l'engagement des premières interactions entre N-cadhérine permet de stabiliser la cadhérine à la jonction ce qui renforce l'adhérence entre cellules (El Sayegh et al., 2005). En effet, suite à l'activation de Rac par le complexe à base de N-cadhérine, la cortactine est alors recrutée au niveau des premiers contacts intercellulaires. En parallèle de cela, la protéine kinase Fer s'associe au complexe à base de N-cadhérine et peut alors phosphoryler la cortactine (El Sayegh et al., 2004) (El Sayegh et al., 2005) (**Cf. Figure 18**), ce qui corrèle avec un renforcement de l'adhérence intercellulaire.

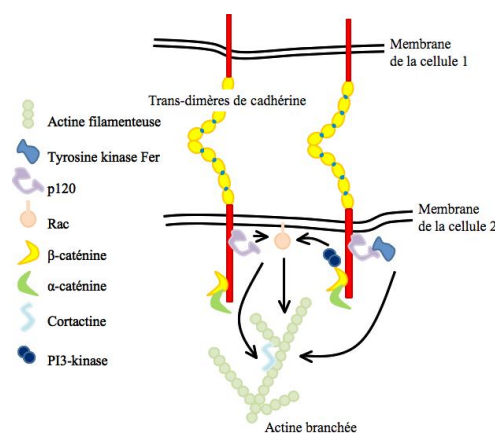


Figure 18 : Modifications du complexe à base de N-cadhérine et de l'organisation de l'actine suite à la formation des premiers contacts intercellulaires.

(D'après (Mege et al., 2006))

L'association en trans des molécules de N-cadhérine associée à p120 induit l'activation de Rac et de la PI3K permettant la nucléation de l'actine par Arp 2/3 (non représentée sur ce schéma). En parallèle, la kinase fer s'associe au complexe à base de N-cadhérine et phosphoryle la cortactine permettant la stabilisation de la cadhérine au contact intercellulaire.

Au vue de ces observations, la N-cadhérine peut donc être considérée comme une molécule d'adhérence capable de réguler la formation de la jonction adhérente en favorisant la transduction des messages extracellulaires vers l'intérieur de la cellule et de générer ainsi des messages signalétiques. La réorganisation de l'actine donne naissance à la formation de

lamellipodes. Ces protrusions membranaires permettent d'agrandir la surface de contact entre deux cellules voisines ce qui favorise l'interaction des molécules de N-cadhérine de proche en proche. Ceci induit alors l'extension des contacts intercellulaires (**Cf. Figure 19**).

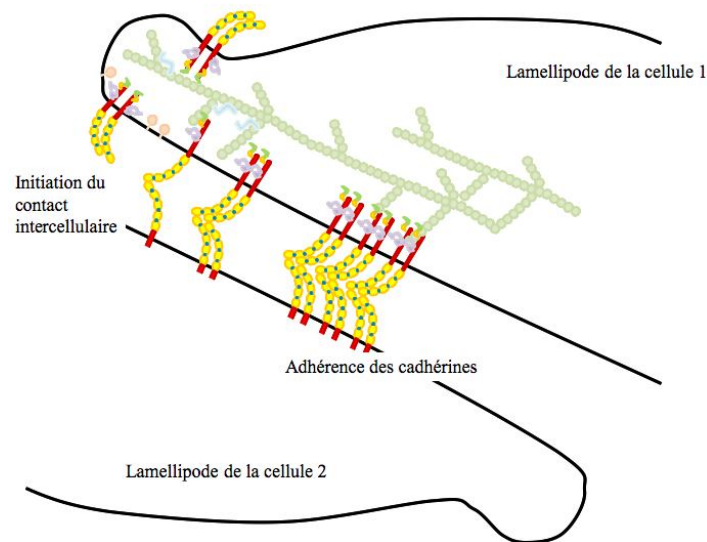


Figure 19 : Représentation schématique de la formation du lamellipode suite aux premières interactions entre molécules de N-cadhérine de cellules voisines.

(D'après (Mege et al., 2006))

Comme décrit dans la figure 18, l'engagement des premières N-cadhérines présentes sur deux cellules voisines modifie l'organisation de la membrane. Ceci se traduit par la formation d'un lamellipode. Cette structure permet d'agrandir la surface d'interaction entre les molécules de N-cadhérine. (La représentation schématique des molécules est la même que dans la figure 18).

En outre, un autre mécanisme de stabilisation de la N-cadhérine à la membrane a été mis en évidence. En effet, les radeaux lipidiques ont été assimilés à des stabilisateurs de la N-cadhérine au niveau de la membrane. Ils rigidifient les membranes où les molécules de N-cadhérines sont enchâssées et empêchent la cadhérine de diffuser librement à la membrane. Ils obligent ainsi la cadhérine à former des liaisons homophiliques (Causeret et al., 2005). En complément de ce modèle, p120 se lie préférentiellement à la N-cadhérine des radeaux ce qui stabiliserait la N-cadhérine à la membrane en la protégeant de l'endocytose (Taulet et al., 2009).

◆ Fonctions de la N-cadhérine

• Formation des circuits neuronaux et maintien de la synapse

La N-cadhérine est une molécule d'adhérence qui favorise la formation du réseau neuronal et se présente comme un acteur clé dans la croissance et la guidance des axones et des dendrites (Hansen et al., 2008). Plus précisément, l'association de la cadhérine au récepteur de croissance fibroblastique (Fibroblast Growth Factor Receptor) constitue un complexe protéique qui favorise la croissance des neurites. Le domaine EC-4 de la N-cadhérine peut physiquement interagir avec le motif HAV du récepteur FGF (Williams et al., 2001). Cette interaction induit l'activation de la phospholipase C γ (ou PLC γ) ce qui permet la croissance des axones et des dendrites (Saffell et al., 1997). La N-cadhérine n'est pas indispensable à la formation de la synapse mais contribue à son organisation fonctionnelle et structurale. Au cours de la maturation de la synapse, la cadhérine se rassemble sous forme de cluster au niveau du contact cellule-cellule et renforce ainsi l'adhérence entre les cellules (Bruses, 2000). Ce phénomène augmente l'efficacité de la synapse (Bruses, 2006). Au cours de l'établissement du contact entre deux neurones, la N-cadhérine change de partenaires cytoplasmiques. Initialement associée à p120 et à la β -caténine, la N-cadhérine des contacts interneuronaux matures s'associe alors préférentiellement à la γ -caténine et la préseniline (Rubio et al., 2005) (Chauvet et al., 2003). Ce changement stabilise la N-cadhérine à la synapse puisqu'elle reste associée au cytosquelette stable. En effet, p120 qui n'est plus associée à la cadhérine, peut alors inhiber l'activité de RhoA, régulateur positif de la dynamique du cytosquelette.

• Migration cellulaire

Au cours de la phase EMT, un switch d'expression entre la E- et la N-cadhérine est observé. L'augmentation de l'expression de la N-cadhérine confère à la cellule un phénotype motile (Islam et al., 1996). Ces changements morphologiques sont en partie liés à des modifications du cytosquelette d'actine. La N-cadhérine agit comme un activateur de la nucléation du cytosquelette d'actine et induit ainsi la formation de structures membranaires telles que les lamellipodes en passant par la voie de signalisation PI3K (PhosphoInositide Kinase-3)-Rac1 (Gavard et al., 2004).

La N-cadhérine peut moduler l'assemblage des plaques d'adhérence en s'associant à la protéine Fer, et alors, par ce biais, contrôler la migration. En effet, des peptides compétiteurs du domaine de liaison de la cadhérine pour la protéine Fer induisent un relargage de cette dernière. Fer

s'associe alors aux adhérences focales ce qui induit une déstructuration des adhérences focales (Arregui et al., 2000).

Le FGF-R est une fois de plus impliqué dans la biologie de la N-cadhérine, notamment dans la régulation de la migration. La formation du complexe FGF-R/N-cadhérine induit des voies de signalisation qui favorisent l'invasivité de la cellule (Suyama et al., 2002). Suite à un traitement au FGF-2, ce complexe protéique induit l'activation persistante de la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)-ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) et empêche le FGF-R d'être dégradé suite à l'endocytose. En parallèle, l'expression de la métalloprotéase MMP-9 est activée. La cellule devient beaucoup plus invasive (Hulit et al., 2007) (Suyama et al., 2002).

• Contrôle de la myogenèse

Les myoblastes expriment la N-cadhérine. Cette cadhérine engagée dans des contacts intercellulaires engendre des signaux intracellulaires indispensables à la différenciation myogénique et contrôle la myogenèse (Charrasse et al., 2002). En effet, la N-cadhérine induit l'activation de RhoA, qui à son tour active l'expression d'une protéine déterminante pour le muscle squelettique : MyoD responsable de la différenciation des cellules du muscle squelettique. En plus de l'activation de MyoD, la N-cadhérine active deux autres promoteurs spécifiques du muscle squelettique et inhibe l'activité de deux GTPases (Cdc42 et Rac1), connues à l'origine pour interférer dans la myogenèse.

• Régulation de l'ostéogenèse

La N-cadhérine est un régulateur important de l'ostéogenèse et de la différenciation des ostéoblastes. *In vitro*, dans des cultures d'ostéoblastes, le blocage de la fonction adhésive de la N-cadhérine soit par l'utilisation de peptides compétitifs constitués de la région extracellulaire, soit par l'expression d'une N-cadhérine mutante tronquée dans sa partie extracellulaire ou soit par l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie extracellulaire de la N-cadhérine, corrèle avec une baisse drastique de l'expression de certains gènes typiques des ostéoblastes tel que le gène codant pour l'ALP (Alkaline Phosphatase), le gène codant pour l'ostéocalcine et le gène codant pour le collagène de type I (Cheng et al., 2000) (Ferrari et al., 2000) (Marie, 2002). L'adhérence cellule-cellule médiée par la N-cadhérine joue donc un rôle essentiel dans la formation de l'os. Cependant, la N-cadhérine peut aussi contrôler négativement la formation de l'os (Arnsdorf et al., 2009) (Hay et al., 2009a), notamment en bloquant la prolifération et la survie des ostéoblastes (Hay et al., 2009b). La N-cadhérine inhibe l'ostéogenèse en interférant négativement avec des voies de signalisation clé au cours de l'ostéogenèse comme par exemple la voie Wnt-3 qui, une

fois activée, permet l'activation de l'expression de gènes des ostéoblastes (Hay et al., 2009a). Dans des ostéoblastes issus de souris transgéniques surexprimant la N-cadhérine, les gènes marqueurs des ostéoclastes tels que Runx2, Osx, AILP, et le gène codant pour le collagène de type 1, ont un niveau d'expression beaucoup plus bas que chez la souris sauvage. En empruntant des voies différentes, la N-cadhérine pourrait donc être une molécule d'adhérence permettant de réguler finement la formation et la croissance de l'os.

• Rôle dans l'apoptose

Le rôle de la N-cadhérine dans la survie cellulaire est contradictoire et semble être dépendant du type cellulaire étudié. Elle peut promouvoir la survie des cellules cancéreuses comme le mélanome ou les cellules du carcinome de la prostate (Tran et al., 2002) (Li et al., 2001). L'interaction homophile entre N-cadhérines induit l'activation de la PI3K qui active à son tour Akt/PKB. Ceci a pour conséquence d'inactiver la molécule pro-apoptotique Bad (Bcl-2 antagonist of cell death). De plus, au sein des ostéoblastes, la N-cadhérine régule la survie et la prolifération de ces cellules. La surexpression de cette cadhérine inhibe la voie Wnt-3a ainsi que la voie de signalisation ERK et PI3K/Akt (Hay et al., 2009b). La N-cadhérine endothéliale, quant à elle, protégerait la cellule endothéliale de l'apoptose en passant par une signalisation dépendante de l'activation du FGF-R (Erez et al., 2004). Des études ont montré que le traitement avec un peptide compétitif du domaine extracellulaire HAV de la N-cadhérine bloque la phosphorylation du FGF-R ce qui corrèle avec une augmentation de la mort cellulaire. L'engagement de la N-cadhérine avec le FGF-R engendrerait des voies signalétiques, bloquerait l'apoptose et favoriserait la survie de la cellule endothéliale. Contrairement aux cellules citées précédemment, la N-cadhérine des cellules embryonnaires humaines de reins inhibe la prolifération en prolongeant la phase G2/M (Kamei et al., 2003). Le mécanisme moléculaire passerait par une inhibition de l'expression de p21 suite à une régulation négative de la signalisation β -caténine/TCF. Ainsi, en fonction du contexte biologique et de la voie de signalisation empruntée, la N-cadhérine représente un véritable régulateur de la prolifération cellulaire.

♦ La N-cadhérine : une cible thérapeutique

La N-cadhérine est la cadhérine prédominante dans les cellules cancéreuses et favorise la migration, la transmigration des cellules cancéreuses et dans certains cas, la survie des cellules tumorales. Elle peut ainsi constituer une cible de choix pour des thérapies anticancéreuses. En 2000, une molécule pentapeptidique antagoniste de la N-cadhérine nommée ADH1 ou Exherin a été découverte (Williams et al., 2000)). Le traitement à base de ADH-1 s'adresse à des tumeurs

qui expriment fortement la N-cadhérine. Cette molécule ne présente aucun signe majeur de toxicité chez l'animal et chez l'homme (Perotti et al., 2009). Elle se révèle efficace pour inhiber la croissance tumorale et la formation de métastase du cancer du pancréas chez la souris (Shintani et al., 2008). En combinaison avec le melphalan, qui est une molécule de chimiothérapie, cette combinaison est encore plus efficace pour traiter les mélanomes chez la souris (Augustine et al., 2008). L'efficacité thérapeutique de l'ADH-1 et du melphalan a été mise en évidence en phase I d'essai clinique chez des patients (Beasley et al., 2009) présentant des mélanomes à un stade avancé.

◆ La N-cadhérine dans l'endothélium

• Une localisation subcellulaire originale

La localisation de la N-cadhérine endothéliale diffuse et donc originale pour une cadhérine classique. Elle pourrait dépendre d'une autre cadhérine classique spécifique des cellules endothéliales : la VE-cadhérine. Deux études *in vitro* basées sur l'analyse de la localisation des deux cadhérines dans des modèles hétérologues ont permis d'apporter quelques éléments de réponse concernant cette hypothèse. Tout d'abord, dans un modèle hétérologue CHO, il a été montré que les CHO transfectées par la VE-cadhérine voient leur N-cadhérine endogène chassée des structures jonctionnelles, lieu où elle persiste en absence de VE-cadhérine (Navarro et al., 1998). Par ailleurs, la capacité d'exclusion engendrée par la VE-cadhérine est spécifique entre la VE- et la N-cadhérine, puisque la VE-cadhérine ne peut modifier la localisation de la E- et de la P-cadhérine (Jaggi et al., 2002). Cependant, le mécanisme d'exclusion dans les cellules endothéliales, en particulier *in vivo*, est encore bien peu caractérisé.

• Fonctions de la N-cadhérine au sein de l'endothélium

- ***Recrutement des péricytes au cours du développement vasculaire.***

Depuis de nombreuses années, il est généralement admis que la N-cadhérine participe au recrutement des péricytes ce qui permet la stabilisation des vaisseaux au cours des étapes tardives de l'angiogenèse. Ainsi, elle engendrerait des interactions homophiliques hétérotypiques entre la cellule endothéliale et la couche de cellules murales sous-jacente comme les péricytes ou cellules musculaires lisses (Cavallaro et al., 2006). En effet, il a été montré que la déficience en N-cadhérine entraîne une diminution significative de la couverture péricytaire au cours de

l'angiogenèse (Tillet et al., 2005) (Gerhardt et al., 2000) (Cavallaro et al., 2006). De plus, suite à un traitement avec des anticorps dirigés contre la N-cadhérine, les cellules endothéliales des embryons de poulet perdent l'interaction avec les péricytes (Gerhardt et al., 2000). Ces observations s'accompagnent d'hémorragies et d'une morphogenèse vasculaire aberrante. La stabilisation de l'interaction entre la cellule endothéliale et la cellule murale serait régulée par l'activation du récepteur S1P1 suite à sa liaison au Sphingosine 1-Phosphate (S1P). Ce récepteur organiserait de manière précise la localisation de la N-cadhérine entre les deux types cellulaires ce qui renforcerait l'adhérence entre ces cellules. En effet, le récepteur S1P1 activerait Rac et permettrait la polymérisation des microtubules ce qui organiserait le trafic intracellulaire de la N-cadhérine jusqu'aux contacts formés entre la cellule endothéliale et la cellule murale (Paik et al., 2004). Cependant, en 2006, des études menées sur l'embryon spécifiquement déficient en N-cadhérine endothéliale ont montré que cette cadhérine jouerait un rôle plus précoce au cours de la morphogenèse vasculaire et ceci avant la stabilisation du vaisseau déjà formé par les cellules murales. En effet, l'embryon déficient en N-cadhérine meurt à des stades de développement précoce (Luo and Radice, 2005) et copie le phénotype de l'embryon déficient en VE-cadhérine. Cependant, la déficience en N-cadhérine entraîne également dans ce modèle, une régulation négative de l'expression de la VE-cadhérine. Aux vues de l'importance capitale de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse, ces observations laissent ainsi planer un doute non négligeable concernant la véritable cause de la désorganisation du système vasculaire chez ces embryons.

-Transmigration des cellules cancéreuses

La N-cadhérine des cellules endothéliales engendre des interactions hétérotypiques avec la N-cadhérine de certaines cellules cancéreuses comme les mélanomes (Sandig et al., 1997) (Qi et al., 2005). Cette interaction favorise la transmigration de la cellule cancéreuse du sang dans les tissus sous-jacents ce qui engendrerait la diffusion métastatique (Qi et al., 2006). Bien que les mécanismes moléculaires de ce phénomène restent encore inconnus, le changement de la localisation de la N-cadhérine endothéliale permet la formation de contacts entre la cellule endothéliale et la cellule cancéreuse et favorise sa transmigration (Qi et al., 2005). En parallèle, la kinase Src, en contrôlant de la phosphorylation de la N-cadhérine, régule le passage des cellules cancéreuses au travers de la monocouche de cellules endothéliales (Qi et al., 2006).

f. La VE-cadhérine

♦ Découverte et patron d'expression

La cadhérine endothéliale vasculaire ou VE-cadhérine est la protéine adhésive majoritaire de la jonction adhérente endothéliale. En 1991, elle a été identifiée pour la première fois par Suzuki (Suzuki et al., 1991). En parallèle, une année plus tard, la même cadhérine a été mise en évidence par l'équipe de Dejana grâce à un anticorps dirigé spécifiquement contre cette protéine (7B4) (Lampugnani et al., 1992). Bien qu'elle soit exclusivement exprimée par les cellules endothéliales chez l'adulte, elle peut être présente au sein de cellules n'ayant pas atteint leur stade de différenciation ultime comme les cellules du cytotrophoblaste ainsi que par les progéniteurs endothéliaux circulants mais son expression non endothéliale est très limitée. Depuis peu, il a été rapporté que certaines cellules cancéreuses comme les cellules de gliomes, les cellules du mélanome ou certains sous types d'astrocytes pouvaient exprimer la VE-cadhérine (Boda-Heggemann et al., 2009) (Hendrix et al., 2001).

♦ Organisation de la VE-cadhérine à la jonction

La VE-cadhérine est une cadhérine classique de type II. Elle présente de nombreuses similarités comparée aux autres cadhérines classiques du point de vue structurale. Sa fonction adhésive est régie par son domaine extracellulaire et par le biais de son domaine intracellulaire, elle peut se lier aux caténines (l' α -, la β -, la γ -caténine et la caténine p120) ce qui lui permet d'être reliée au cytosquelette d'actine.

Des travaux récents ont mis en évidence que l'organisation membranire de la VE-cadhérine présentait quelques spécificités. L'équipe de Gulino-Debrac a ainsi mis en évidence pour la première fois que l'annexine 2 pouvait s'associer à la VE-cadhérine et était susceptible, grâce à sa liaison à l'actine, de réguler l'organisation et la stabilité membranaire de la cadhérine aux contacts interendothéliaux (Heyraud et al., 2008). En effet, les cellules endothéliales HUVECs traitées au siRNA dirigé contre l'annexine 2 ne présentaient plus de VE-cadhérine à la jonction. En outre, les radeaux lipidiques connus pour rigidifier des parcelles membranaires, sembleraient également impliqués dans la stabilité de la VE-cadhérine membranaire. Suite au traitement avec une drogue visant à déstabiliser les radeaux lipidiques comme la méthyl- β -cyclodextrine (MBCD), l'annexine 2 se voit chassée de ces microdomaines et la VE-cadhérine perd sa localisation jonctionnelle. L'annexine 2 serait une protéine bi-fonctionnelle dans la stabilité de la VE-cadhérine jonctionnelle, permettant d'ancrer la VE-cadhérine au cytosquelette d'actine et aux radeaux de cholestérol (Cf. **Figure 20**).

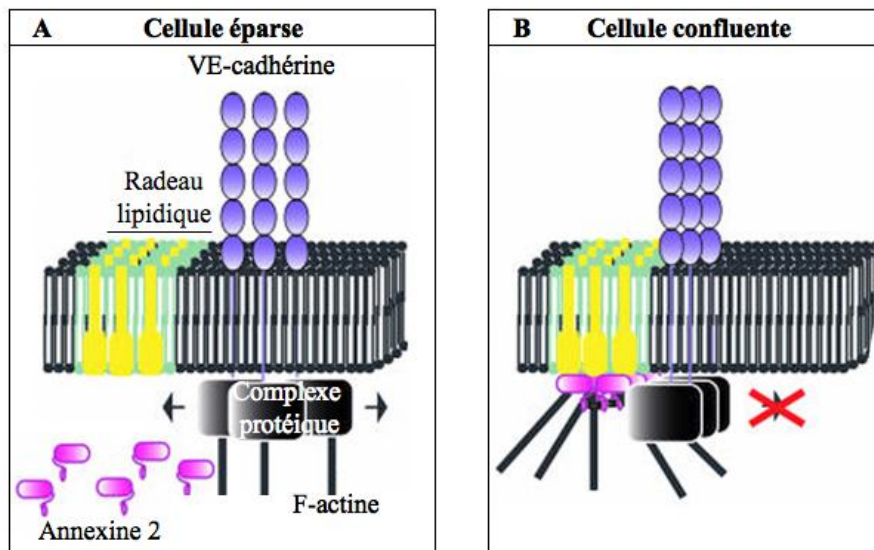


Figure 20 : Organisation moléculaire du complexe à base de VE-cadhérine au sein des jonctions adhérentes

(D'après (Heyraud et al., 2008))

- A. Dans des cellules éparées, les jonctions adhérentes sont immatures et associées faiblement au cytosquelette d'actine et l'annexine 2 est principalement cytoplasmique. Le complexe à base de VE-cadhérine peut diffuser librement dans la membrane (flèches noires).
- B. Une fois la confluence atteinte, la jonction adhérente est alors mature. L'annexine 2 s'associe à la fois au radeau lipidique et à la VE-cadhérine. Ainsi, la formation de ce complexe permet de stabiliser la VE-cadhérine à la membrane. L'annexine 2 est un nouveau partenaire de la VE-cadhérine permettant donc de stabiliser la jonction adhérente.

◆ Base moléculaire de la fonction adhésive de la VE-cadhérine : assemblage homotypique hexamérique

La capacité adhésive de la VE-cadhérine est dépendante des domaines extracellulaires. L'organisation des structures vasculaires est régie par ce complexe adhésif, ce qui montre l'importance de l'étude de la formation de la liaison homophilique. L'assemblage des domaines extracellulaires de la VE-cadhérine est original pour une cadhérine classique. À l'inverse de l'organisation tétramérique des dimères de E- ou de N-cadhérine, le complexe extracellulaire de VE-cadhérine s'organise sous forme d'hexamères (Cf. Figure 21).

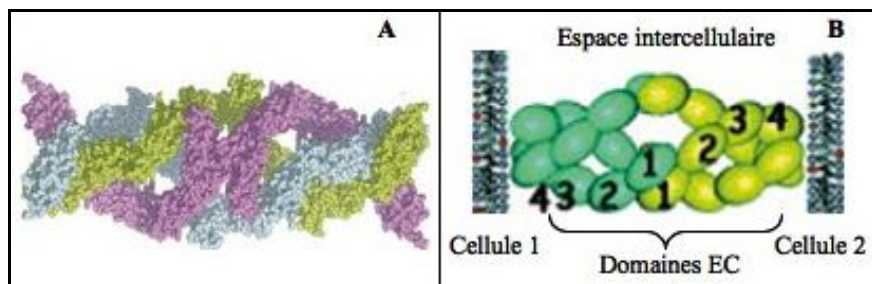


Figure 21 : Assemblage homotypique hexamérique de la VE-cadhérine

(D'après (Hewat et al., 2007))

Les domaines extracellulaires (EC)-1,-2,-3 et 4 de la VE-cadhérine sont représentés en violet, bleu et vert (A). Ils forment en *cis* un trimère. Ce trimère s'associe par la suite avec un trimère antiparallèle. La partie B de la figure représente un schéma simplifié de l'interaction des domaines extracellulaires. Les numéros correspondent aux numéros des domaines EC.

Deux différents modèles ont été établis afin de comprendre l'assemblage entre les domaines extracellulaires de la VE-cadhérine. Le premier modèle a été déduit à partir de fragments recombinants constitués des domaines EC1 à EC4 (Hewat et al., 2007). Trois domaines extracellulaires parallèles de VE-cadhérine s'organisent pour former une triple hélice (Bibert et al., 2002) (Lambert et al., 2005). L'interaction entre les trois molécules de VE-cadhérine est dépendante du domaine EC3-EC4. Cette structure trimérique interagit par la suite de manière tête-bêche avec une autre triple hélice grâce au domaine EC1. Un deuxième groupe de recherche a mis en évidence l'association parallèle de 3 molécules de VE-cadhérine à partir de fragments issus de l'expression du domaine EC1 à EC5 fusionnés à la partie N-terminale de la partie « coil-coiled » de la protéine CMP (Cartilage Matrice Protein) dans des cellules eucaryotes 293-HEK (Ahrens et al., 2003). Cependant contrairement aux résultats de Lambert, ce trimère n'est pas capable d'interagir en trans avec un autre trimère via leur domaine EC1.

◆ Fonctions de la VE-cadhérine dans l'endothélium

La fonction biologique de la VE-cadhérine au sein de la cellule endothéliale a été caractérisée *in vivo* et *in vitro* et l'ensemble des données converge vers un rôle clé de la VE-cadhérine dans l'organisation du réseau vasculaire au cours de l'angiogenèse.

• Rôle de la VE-cadhérine dans l'organisation du réseau vasculaire

Tout d'abord, l'analyse des embryons déficients pour la VE-cadhérine a montré des phénotypes sans équivoque. Ces embryons meurent à des stades de développement précoce (9 jours ½) à cause de graves malformations du réseau vasculaire (Gory-Faure et al., 1999) (Carmeliet et al., 1999). Bien que les cellules embryonnaires déficientes en VE-cadhérine se différencient correctement en cellules endothéliales, le remodelage vasculaire est perturbé et l'angiogenèse est incomplète (**Cf. Figure 22**). Les annexes embryonnaires comme le sac vitellin présentent les plus graves malformations vasculaires. En effet, bien que les cellules des îlots sanguins se différencient correctement en cellules endothéliales, ces dernières restent isolées et n'établissent pas de plexus vasculaire primaire. Ces résultats montrent clairement que la VE-cadhérine est indispensable à la morphogenèse vasculaire. De plus, d'autres résultats viennent appuyer ce constat. Les bourgeons vasculaires issus des corps embryoides (EBs, Embryoid Bodies) issus de cellules souches embryonnaires déficientes en VE-cadhérine présentent une désorganisation complète (Feraud et al., 2001). L'analyse de la déficience en VE-cadhérine au sein du modèle de poisson-zèbre met également en évidence l'importance capitale de la VE-cadhérine dans la formation d'un réseau vasculaire stable et fonctionnel (Montero-Balaguer et al., 2009). Toutefois, quelques nuances ont été montrées.

En effet, ces études démontrent le rôle de cette molécule d'adhérence dans la mise en place des connections vasculaires permettant de stabiliser le réseau vasculaire néo-formé et d'inhiber ainsi un bourgeonnement anarchique des cellules endothéliales. Ce phénomène s'explique par l'activation de la contractibilité de l'actomyosine par la chaîne légère de la myosine 2 (MLC2, Myosin Light Chain 2) qui est activée par la kinase Rho suite à l'engagement des molécules de VE-cadhérine au début du contact entre deux cellules (Abraham et al., 2009). La contractibilité de l'actomyosine induit une accumulation de la VE-cadhérine au niveau des jonctions ce qui renforce ainsi la force de l'adhérence interendothéliale et la stabilité du bourgeon endothélial.

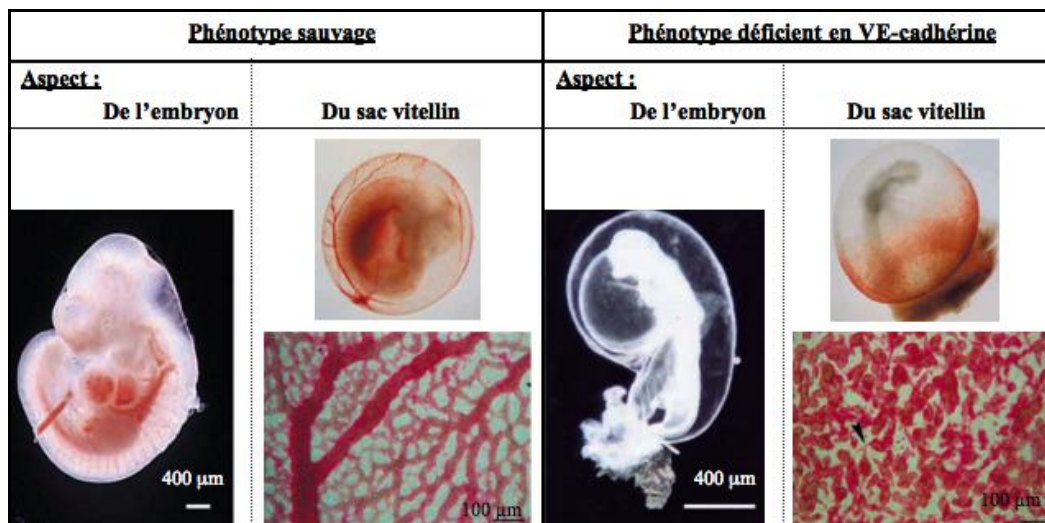


Figure 22 : Importance de la VE-cadhérine dans la formation du réseau vasculaire : comparaison des embryons et des sacs vitellins sauvages et déficients en VE-cadhérine

(Adapté de (Gory-Faure et al., 1999))

Les embryons déficients en VE-cadhérine à un stade de développement de 9 jours $\frac{1}{2}$ présentent de graves malformations du réseau vasculaire et un retard de croissance très prononcé. Les vaisseaux sanguins des sacs vitellins sont extrêmement désorganisés comme le montre le marquage PECAM

• Modulation de la survie cellulaire

Alors que les connaissances des voies de signalisation induites par la VE-cadhérine étaient encore limitées, la β -caténine a été pressentie comme partenaire capable d'induire des voies de signalisation. En effet, de précédentes études ont montré l'importance du complexe VE-cadhérine/ β -caténine dans l'inhibition de contact et dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Caveda et al., 1996). Ainsi, des embryons qui expriment la VE-cadhérine tronquée pour le domaine de liaison à la β -caténine ont été générés (Carmeliet et al., 1999). De manière similaire aux embryons déficients en VE-cadhérine entière, ces embryons présentent une insuffisance vasculaire létale qui est corrélée à l'apoptose des cellules endothéliales. Le rôle anti-apoptotique du domaine de liaison de la β -caténine de la VE-cadhérine ferait intervenir le VEGFR-2.

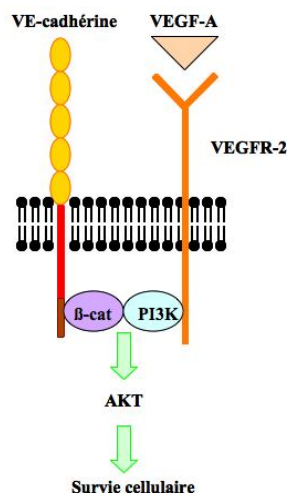


Figure 23 : Rôle du domaine de liaison de la VE-cadhérine pour la β -caténine dans la survie de la cellule endothéliale

(D'après (Carmeliet and Collen, 1999))

La liaison du VEGF-A au VEGFR-2 induit la formation d'un complexe entre la VE-cadhérine et le VEGFR-2. Ces molécules sont associées respectivement à la β -caténine et à la PI3K ce qui induit la formation d'un complexe multiprotéique entre ces molécules et engendre l'activation de la kinase AKT. Ceci favorise alors la survie cellulaire.

La formation d'un complexe multiprotéique entre le VEGF-R2 et le domaine de liaison de la β -caténine de la VE-cadhérine permettrait de recruter la PI3K et induirait l'activation d'Akt qui à son tour active la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (**Cf. Figure 23**). De plus, il a été également démontré que l'activation de la voie PI3K suite à la formation du complexe VEGFR-2/VE-cadhérine, permettait la surexpression du gène *gas* dont l'expression est requise pour inhiber l'apoptose (Spagnuolo et al., 2004). Ainsi, il est clair que le complexe VEGF-R2/VE-cadhérine est un complexe clé dans la survie de la cellule endothéliale.

• Régulation de la prolifération cellulaire

Lors de la formation du plexus vasculaire, le VEGF est une molécule clé pour la prolifération de la cellule endothéliale. En se liant au VEGFR-2, il induit la multiplication des cellules endothéliales qui formeront par la suite de nouveaux vaisseaux. La VE-cadhérine est connue pour inhiber la prolifération de la cellule endothéliale, notamment en permettant l'inhibition de contact. Il ne serait donc pas étonnant que cette cadhérine interfère dans la voie de signalisation du VEGF-R2. Effectivement, des études ont montré que contrairement aux cellules déficientes en VE-cadhérine confluentes et stimulées au VEGF, les cellules endothéliales

exprimant la VE-cadhérine prolifèrent peu (Grazia Lampugnani et al., 2003). De manière plus précise, la VE-cadhérine associée à la β -caténine formerait un complexe avec le VEGFR-2 et inhiberait ainsi la prolifération. En effet, les cellules exprimant la forme tronquée de la VE-cadhérine pour le domaine de liaison à la β -caténine prolifèrent de la même manière que les cellules déficientes en VE-cadhérine. De plus, ce complexe protéique formerait un lieu d'ancrage pour la phosphatase DEP1 (Density Enhance Phosphatase 1). Ainsi, suite à l'activité de cette dernière, le VEGFR-2 verrait son activité tyrosine kinase inhibée, ce qui inactiverait la voie des MAP kinase (p44/42) impliquée dans la prolifération cellulaire. Il semblerait également que l'association de la VE-cadhérine au VEGFR-2 potentialiserait l'inhibition de la phosphorylation du VEGFR-2 (Lampugnani et al., 2006), puisqu'en absence de VE-cadhérine, le VEGFR-2 est alors endocyté et séjourne plus longtemps dans des vésicules de clathrine. Cette endocytose n'aboutirait pas à une dégradation du récepteur mais prolongerait la phosphorylation du récepteur et de cette manière, maintiendrait la voie de signalisation active.

En outre, toujours de manière VEGF dépendante, la VE-cadhérine contrôlerait la prolifération cellulaire grâce à son association à Shc, molécule connue pour activer la voie des MAP kinases. Ce faisant, Shc serait donc séquestrée par la VE-cadhérine et ne pourrait plus participer à des voies d'induction de la prolifération cellulaire (Zanetti et al., 2002).

Bien que la régulation de la prolifération par la VE-cadhérine dans des voies de signalisation dépendante du VEGF soit la plus connue, d'autres mécanismes anti-prolifératifs VE-cadhérine dépendants ont été mis en évidence. La tyrosine 685 phosphorylée de la VE-cadhérine est capable de lier les protéines kinase Src et Csk de façon mutuellement exclusive (Baumeister et al., 2005) (Wallez et al., 2007). Csk associée à la VE-cadhérine semble réguler la prolifération cellulaire et l'inhibition de contact. En effet, des CHO exprimant la VE-cadhérine mutée sur la tyrosine 685 perdent l'inhibition de contact et prolifèrent continuellement. Également, dans des cellules endothéliales humaines, la perte d'expression de Csk par stratégie siRNA augmente la prolifération cellulaire. Une autre étude a également montré que la VE-cadhérine était impliquée dans le maintien de l'état non-prolifératif de la cellule en régulant négativement l'expression de la survivine, protéine impliquée dans le contrôle de la division cellulaire (Iurlaro et al., 2004).

Ces résultats montrent que la VE-cadhérine est une molécule clé dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales. Elle constituerait une véritable plateforme protéique permettant le recrutement de partenaires cytoplasmiques impliqués dans des voies d'induction de la prolifération cellulaire et pourrait alors interférer dans de telles voies de transduction.

• Rôle de la VE-cadhérine dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire

L'absence de VE-cadhérine modifie profondément l'organisation de la jonction interendothéliale. Les cellules qui forment les sacs vitellins des embryons déficients en VE-cadhérine présentent des contacts interendothéliaux lâches. Cette observation suggère le rôle clé de cette cadhérine dans le contrôle de la perméabilité. En effet, le blocage de la fonction adhésive de la VE-cadhérine à l'aide d'anticorps spécifique de son domaine extracellulaire induit une augmentation de la perméabilité (Corada et al., 1999). Ainsi de très nombreuses études ont tenté de mettre en évidence les mécanismes moléculaires VE-cadhérine-dépendant responsable du maintien de la barrière endothéliale. La phosphorylation sur tyrosine, le clivage ainsi que l'internalisation de la VE-cadhérine sont les trois principales modifications moléculaires de la VE-cadhérine qui sont corrélées avec l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium (Cf. **Figure 24**).

- *Phosphorylation sur tyrosine du complexe adhérent à base de VE-cadhérine et contrôle de la perméabilité*

La phosphorylation de la VE-cadhérine et de ses partenaires cytoplasmiques est couramment associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Tout d'abord, au sein de culture cellulaire endothéliale *in vitro*, la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine est dépendante de l'état de confluence des cellules. En effet, contrairement à la VE-cadhérine des cellules confluentes, la VE-cadhérine des cellules éparses présente un taux de phosphorylation sur tyrosine plus importante (Lampugnani et al., 1997). De plus, de nombreuses études ont montré que la perméabilité paracellulaire induite suite à des traitements avec des agents perméabilisants, était associée à une augmentation de la phosphorylation de la VE-cadhérine (Gavard, 2009) ainsi que celle des partenaires cytoplasmiques préférentiels comme la β -, γ -caténine et p120 (Shasby et al., 2002) (Konstantoulaki et al., 2003) (Angelini et al., 2006).

* Phosphorylation de la VE-cadhérine

Le décryptage exact du mécanisme de la phosphorylation de la cadhérine n'est pas encore totalement abouti. L'acteur le mieux caractérisé dans la phosphorylation de la VE-cadhérine est la kinase Src. Cette kinase est un partenaire de la VE-cadhérine et phosphoryle la VE-cadhérine suite à un traitement au VEGF. En effet, au sein de cellules déficientes en Src ou normales et traitées avec des inhibiteurs de Src, la VE-cadhérine n'est plus phosphorylée (Weis and Cheresh, 2005). De plus, une étude a d'ailleurs identifié la tyrosine 685 comme unique site de phosphorylation de la VE-cadhérine en réponse au VEGF (Wallez et al., 2007). D'autres kinases

peuvent s'associer au complexe VE-cadhérine- β -caténine et modulent la perméabilité en phosphorylant ce complexe. Par exemple, la kinase Csk régule la phosphorylation de la VE-cadhérine de manière indirecte. Cette kinase se lie à la VE-cadhérine phosphorylée et inactive Src par phosphorylation (Baumeister et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré qu'une autre kinase (Pyk2) était impliquée dans le contrôle de la barrière endothéliale et pourrait notamment favoriser la transmigration leucocytaire suite à certains stimuli spécifiques (Allingham et al., 2007). En effet, suite à l'engagement de la molécule d'adhérence ICAM-1 de la cellule endothéliale avec l'ICAM-1 présente à la surface du leucocyte, Pyk-2 est activée et induit la phosphorylation sur les tyrosines 658, 731 et 733 de la VE-cadhérine. Or, ces tyrosines sont comprises au niveau des sites de liaison pour la β -caténine et p120. Une fois ces sites phosphorylés, les caténines ne pourraient plus s'associer à la VE-cadhérine provoquant alors une perte de l'intégrité jonctinelle, ce qui faciliterait le passage paracellulaire des leucocytes. Ainsi, pour chacune de ces études, il apparaît donc que la phosphorylation de certains sites de la VE-cadhérine soit spécifique d'une voie de signalisation induite par un stimulus donné (Dejana et al., 2008). Cependant, ce dogme est remis en question dans une étude très récente. En effet, l'engagement d'une seule voie de phosphorylation conduisant à la phosphorylation de la VE-cadhérine n'est pas suffisant pour induire des modifications de perméabilité para-cellulaire. Il a été montré que la voie de phosphorylation passant par Src n'est pas à elle seule suffisante pour induire une modification de la perméabilité. Ainsi, des modifications cellulaires additionnelles seraient requises (Adam et al., 2010).

En contrepartie, les dé-phosphorylations de la VE-cadhérine engendrées par des phosphatases actives corréleraient avec une meilleure stabilité de la jonction et une baisse de la perméabilité. Par exemple, la phosphatase VE-PTP (Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase) régule la phosphorylation de la VE-cadhérine et de cette manière, diminue la perméabilité paracellulaire. En effet, des études de perméabilité para-cellulaire *in vitro* ont montré que la forme non active de VE-PTP non seulement ne déphosphorylait plus la VE-cadhérine mais surtout ceci s'accompagnait d'une augmentation du passage de molécules fluorescentes au travers de la monocouche de cellules étudiées (Nawroth et al., 2002) (Nottebaum et al., 2008). En outre, d'autres phosphatases ont été mises en évidence dans la régulation de la phosphorylation de la VE-cadhérine et dans la régulation de la stabilité de la jonction. Ainsi, DEP-1 (Grazia Lampugnani et al., 2003), la protéine tyrosine phosphatase du récepteur de type M (PTP μ) (Sui et al., 2005) et SHP2 (Ukropec et al., 2000), sont autant de tyrosines phosphatases qui régulent la phosphorylation de la VE-cadhérine.

* Phosphorylation des caténines

Les caténine comme p120, la β - et la γ -caténine peuvent être également phosphorylée par les mêmes agents qui phosphorylent la VE-cadhérine. Cependant les conséquences de la phosphorylation des caténines en ce qui concerne la perméabilité vasculaire sont encore inconnues ou très peu caractérisées. Dans de nombreuses études, la forme phosphorylée de la β -caténine n'est plus associée à la VE-cadhérine. La dissociation des caténines est alors corrélée avec l'augmentation de la perméabilité (Lilien and Balsamo, 2005).

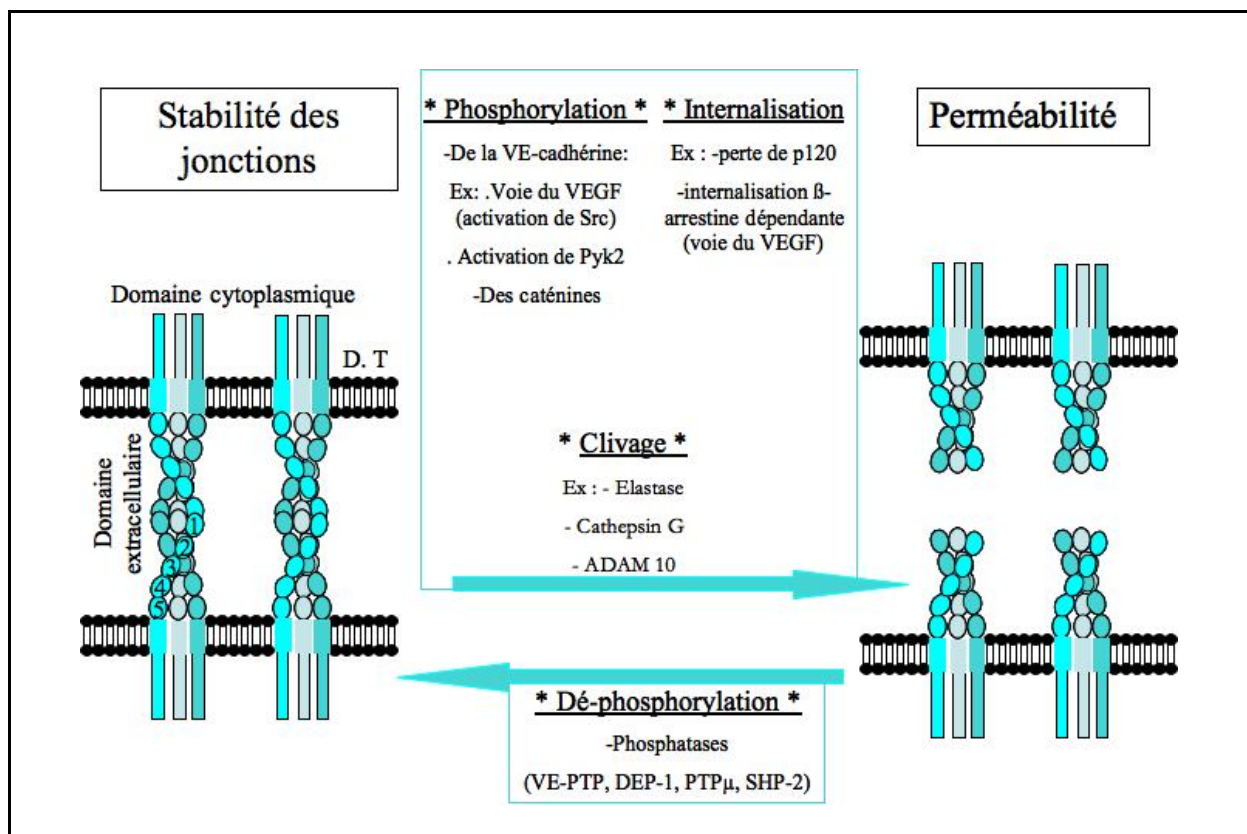


Figure 24 : Schéma récapitulatif des différentes voies modifiant la stabilité des jonctions à base de VE-cadhérine.

La jonction adhérente à base de VE-cadhérine est représentée par un dimère de trimère de VE-cadhérine (représentée en bleu). La VE-cadhérine contrôle la perméabilité de l'endothélium. Les phosphorylations de la protéine par des agents angiogéniques comme le VEGF, l'internalisation de la VE-cadhérine ou le clivage, sont autant de phénomènes aboutissant à la déstabilisation des jonctions. En contre-partie, la déphosphorylation de la VE-cadhérine par des phosphatases empêche cette déstabilisation.

D.T signifie domaine transmembranaire.

- Modulation de la perméabilité par l'internalisation de la VE-cadhérine

La VE-cadhérine peut être internalisée de manière clathrine-dépendante. Ce mécanisme constitue ainsi un autre moyen de déstabiliser les jonctions et d'induire la perméabilité. La caténine p120 est la molécule clé du maintien de la VE-cadhérine à la membrane. Cette caténine protège la VE-cadhérine de la machinerie d'endocytose clathrine-dépendante, en se liant sur les sites d'interaction des protéines participant à l'endocytose (Chiasson et al., 2009) (Xiao et al., 2005). Cependant, un autre mécanisme d'internalisation clathrine-dépendante ne faisant pas intervenir p120 a été observé. Cette voie est initiée par le VEGF qui active Src. Ce dernier phosphoryle et active le facteur d'échange de nucléotide guanylique ou GEF (pour guanine-nucleotide-exchange-factor) VAV2. VAV2 active Rac, qui induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur la sérine 665. La cadhérine phosphorylée sera alors prise en charge et endocytée par la β -arrestin-2 (Gavard and Gutkind, 2006)

- Clivage de la VE-cadhérine et ouverture des jonctions

La VE-cadhérine constitue une barrière naturelle contre le passage des cellules immunitaires. Le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine est particulièrement sensible au clivage protéolytique par les métalloprotéases. Ce phénomène est considéré comme un autre moyen de réguler la perméabilité et la transmigration leucocytaire. En effet, l'elastase, la cathepsin G et ADAM 10 sont des métalloprotéases sécrétées en masse par les cellules immunitaires ou les cellules cancéreuses qui induisent précisément le clivage de la VE-cadhérine (Hermant et al., 2003) (Luplertlop et al., 2006) (Schulz et al., 2008). Ainsi, le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine libéré peut être considéré comme un biomarqueur de certaines pathologies, notamment des pathologies inflammatoires. La mise au point de dosage de la partie extracellulaire constituerait un moyen pour dépister ces maladies inflammatoires.

En conclusion, la VE-cadhérine régule la perméabilité para-cellulaire et permet le maintien de l'intégrité vasculaire par l'intermédiaire des partenaires qui lui sont associés.

♦ La VE-cadhérine et la régulation de la progression tumorale : une cible thérapeutique antiangiogénique de premier ordre.

La VE-cadhérine est spécifique des cellules endothéliales. Elle est fondamentale au cours de l'angiogenèse physiologique et peut donc constituer une cible anti-angiogénique de choix notamment au cours du switch anti-angiogénique pendant la progression tumorale. De nombreuses études ont ainsi montré que l'utilisation d'anticorps bloquant l'activité adhésive de la VE-cadhérine induisait la régression tumorale et surtout l'inhibition de la formation de nouveaux

vaisseaux au sein de la tumeur (Liao et al., 2000). De plus, ces anticorps inhibent spécifiquement la formation de nouveaux vaisseaux sans affecter la stabilité des jonctions des vaisseaux quiescents (Liao et al., 2002) (Corada et al., 2002). Ceci suggère vraisemblablement que la VE-cadhérine présenterait une accessibilité différente de ses épitopes au cours de l'angiogenèse. Sur la base de ces différences structurales, de nouvelles thérapies anti-tumorales spécifiques pourraient être mis en place.

III. Les radeaux lipidiques : centres organisateurs de la membrane cellulaire

Les cellules vivantes possèdent une quantité importante de membranes qui permettent avant tout une séparation physique et une compartimentation des différents organites intracellulaires.

Les membranes rassemblent de nombreuses molécules représentées principalement par des protéines enchâssées ou en interaction avec les molécules lipidiques. Ces associations constituent un système multimoléculaire d'une très grande complexité. Par ailleurs, ce réseau extrêmement complexe peut être lié au cytosquelette d'actine ce qui constitue un niveau d'organisation ultime.

A. Historique de la découverte de la théorie des radeaux

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, des modèles d'organisation de la membrane plasmique ont été proposés afin de comprendre l'interrelation entre l'organisation précise et fine de la membrane et les fonctions biologiques remplies par la membrane.

Au début des années 70, Singer et Nicolson proposèrent le modèle de « mosaïque fluide ». Ce modèle décrit des protéines membranaires pouvant diffuser librement au sein d'une bicouche lipidique fluide. Au fur et à mesure des années, grâce à des nouveaux outils d'analyse de plus en plus perfectionnés comme la technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ou la technique de corrélation de fluorescence par spectroscopie (FCS), le mouvement des molécules membranaires a pu être étudié. Ces techniques ont permis de mettre en évidence des différences de diffusion moléculaire au sein de la membrane. Ceci suggérait que la membrane plasmique présente des hétérogénéités dans sa composition et qu'elle s'organise ainsi en microdomaines.

Ces observations ont donné ainsi lieu à de nouveaux modèles d'organisation dynamique de la membrane, dont le modèle de radeaux lipidiques fait partie. Ce modèle fut établi et proposé en 1988 par deux biologistes, Simons et Van Meer pour expliquer l'asymétrie du transport membranaire (van Meer and Simons, 1988). Ce modèle d'organisation met en avant l'existence de radeaux lipidiques à base de cholestérol et de glycosphingolipides. Ces radeaux permettent de rassembler et de concentrer en un endroit précis de la membrane certaines molécules impliquées dans des voies de signalisation (**Cf. Figure 25**).

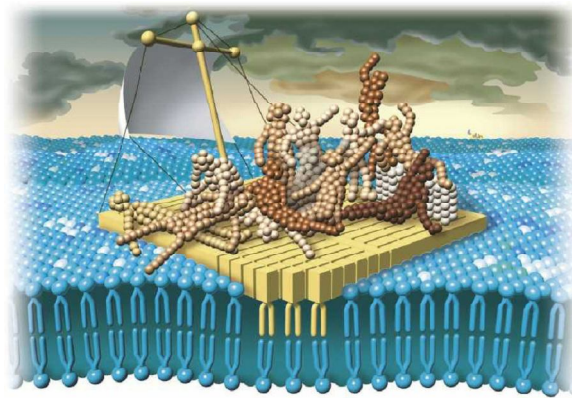


Figure 25 : Illustration du radeau lipidique rassemblant des protéines au niveau de la bicouche lipidique

(D'après Frank Lafont et Gisou van der Goot, Pour la Science 2005)

Les radeaux lipidiques flottent à la surface des cellules. Ils sont constitués de lipides particuliers (en jaune), distincts de ceux du reste de la membrane (en bleu). Des protéines (en marrons) peuvent s'associer aux radeaux.

Ces structures membranaires forment ainsi de véritables plates-formes de signalisation.

B. Description du radeau

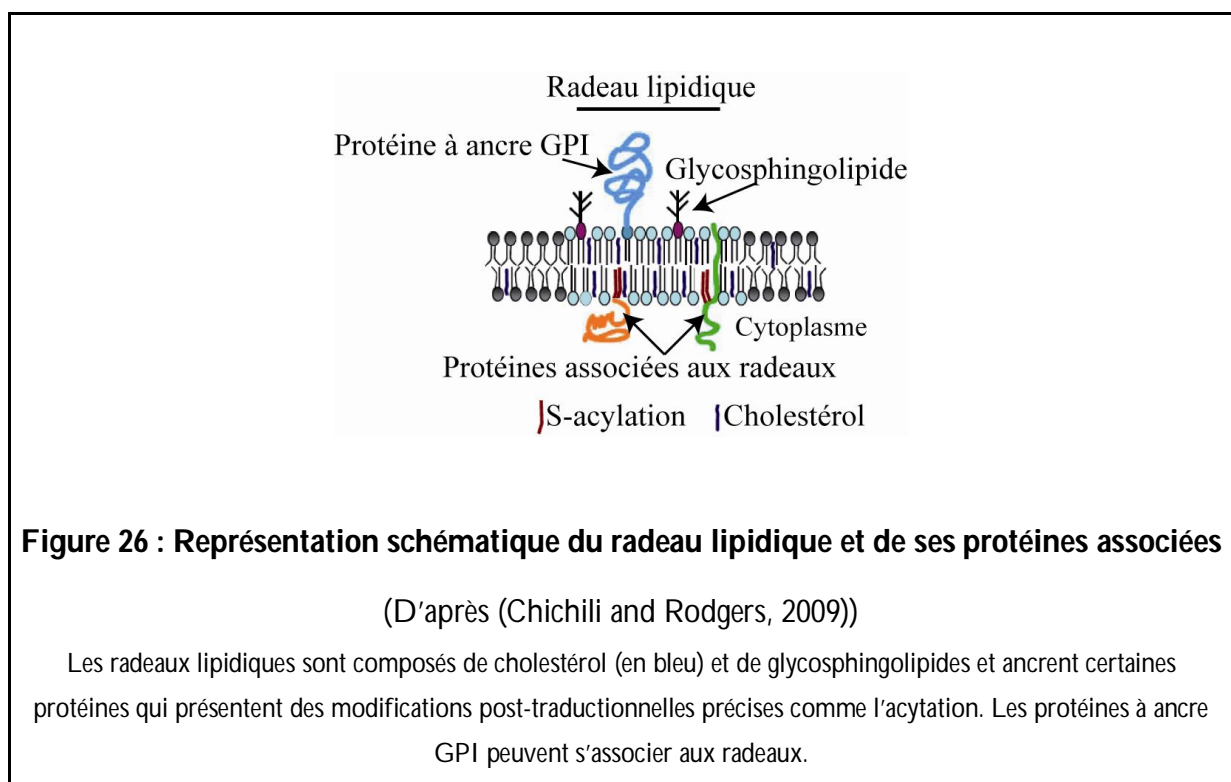
1. Composition en molécules lipidiques

Les radeaux sont des domaines de la membrane particulièrement riches en cholestérol et en glycosphingolipides. Les molécules de cholestérol à proximité des chaînes saturées des sphingolipides induisent une compaction de ces chaînes, ce qui accentue la rigidité de la membrane. Au sein des radeaux, le cholestérol sert de « glue » et permet ainsi la cohésion stable entre les composants du radeau (Simons and Toomre, 2000). Les radeaux créent ainsi des microdomaines membranaires rigides et organisent la membrane. Cette structure est également nommée « phase liquide ordonnée » ou phase l_o alors que la membrane en dehors des radeaux est appelée « phase liquide désordonnée » ou phase l_d .

2. Caractéristiques des protéines associées aux radeaux

Au sein de ces microdomaines, des protéines peuvent s'y associer (Cf. **Figure 26**). Les protéines qui ont la capacité de s'enchâsser spécifiquement aux radeaux présentent des

particularités chimiques (Epand, 2008). Une protéine peut s'associer aux radeaux grâce à des modifications post-traductionnelles comme l'ajout d'un acide gras ou l'ajout d'un composé hydrophobique. L'ajout d'un acide palmitique, d'un acide myristique (Cf. **Figure 26**) sont des modifications qui permettent aux protéines d'interagir avec les radeaux lipidiques (Resh, 2004) (Resh, 2006). La palmitoylation des protéines associées aux radeaux s'observe le plus souvent sur des protéines transmembranaires. L'addition d'une ancre composée d'un glycosphosphatidylinositol (ou ancre GPI) sur la protéine en position N-terminale permet à cette protéine d'être enchâssée au sein des radeaux (Morandat et al., 2002) (Wang et al., 2002) (Sharma et al., 2004).

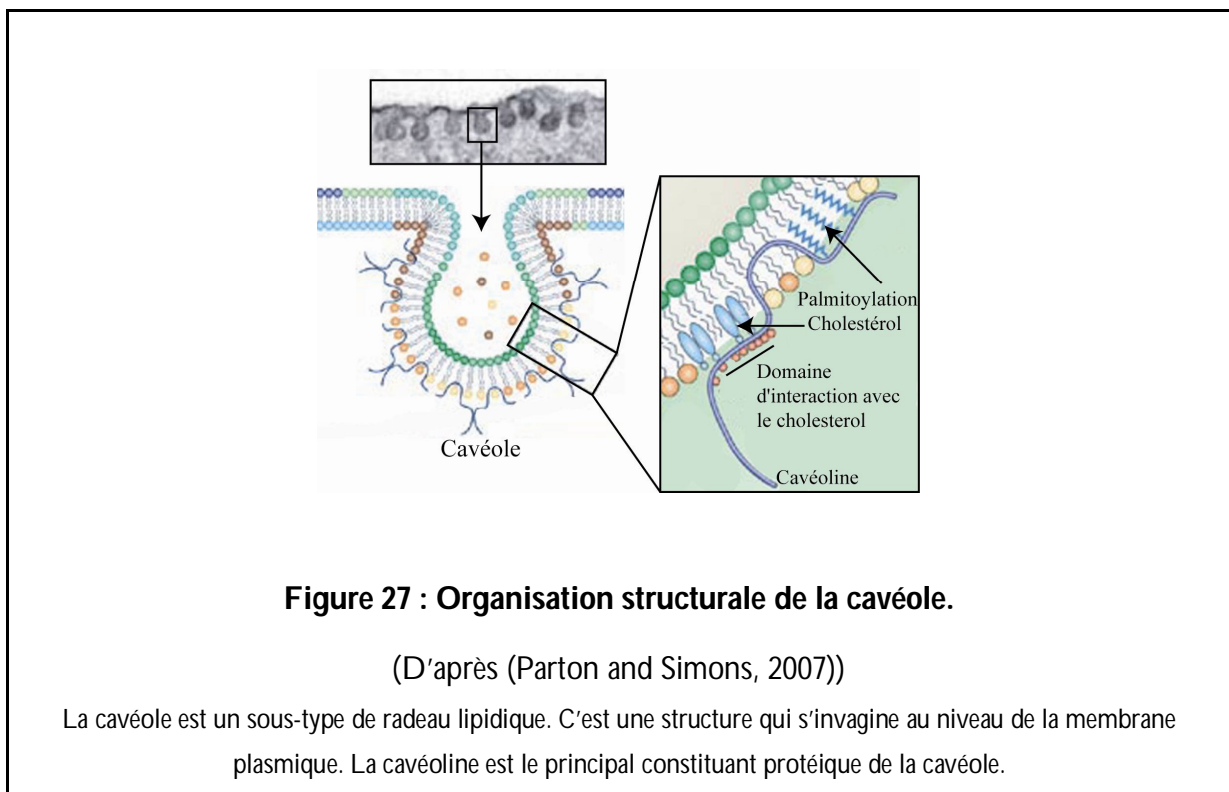


La double acylation des protéines comme certaines kinases de la famille Src ou la sous-unité $G\alpha$ des protéines G hétérotrimériques adresse ces protéines aux radeaux (Webb et al., 2000) (Liang et al., 2001). Certaines protéines sont même capables de se lier de manière covalente au cholestérol (Karpen et al., 2001). Par ailleurs, d'autres protéines s'associent aux radeaux par l'intermédiaire de molécules formant le radeau lipidique. Par exemple, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) est un lipide anionique qui se trouve aux radeaux. Il possède une forte affinité pour le domaine homologue de la pleckstrine (ou PHD), ce qui lui permet d'être associé à de telles molécules. Or, la plupart des protéines comportant un domaine PHD sont connues pour s'associer au cytosquelette d'actine. De cette manière, le PIP2 est un adaptateur lipidique qui permet d'ancrer le cytosquelette d'actine aux radeaux par l'intermédiaire de son association au

protéines à domaine PHD (Yin and Janmey, 2003). De plus, par l'intermédiaire de ce réseau d'actine relié au radeau, des molécules d'adhérence associées à l'actine comme les cadhérines pourraient être, de manière indirecte, enchassées dans ces microdomaines membranaires.

C. La Cavéole : un sous-type de radeau lipidique

La cavéoline et la flotilline sont deux marqueurs protéiques de référence des radeaux lipidiques (Parton et al., 2006) (Langhorst et al., 2005). La cavéoline membranaire, associée à d'autres protéines plasmiques, forme un complexe protéique qui peut modifier la forme de la membrane notamment par des phénomènes d'invagination membranaire. Cette structure nommée cavéole est fortement et étroitement associée aux molécules de cholestérol (Cf. **Figure 27**).



Elle est donc considérée comme un sous-type de radeau lipidique. Elle forme à la surface de la cellule des invaginations membranaires et participe activement à l'endocytose et la transcytose de l'albumine à travers la monocouche de cellules endothéliales (Parton, 1996) (Smart et al., 1999).

D. Propriétés des radeaux au profit de leur extraction

Au début des années 90, Brown et Rose ont réussi pour la première fois à extraire les sphingolipides ainsi que les protéines à ancre GPI. Ils ont ainsi mis en évidence que ces molécules sont insolubles en présence de détergents non ioniques à 4°C. De plus, suite à une centrifugation sur un gradient de sucre, ces molécules se concentrent et flottent à une densité précise du gradient. Elles sont associées à une forte proportion de cholestérol (Brown and Rose, 1992). Cette méthode d'extraction permet ainsi de récupérer les membranes résistantes au détergent (ou DRM) qui correspondent à la phase lo. Le plus souvent, les radeaux lipidiques sont extraits à partir de cette méthode et à partir d'un gradient de sucrose à 40% -30%- et 5 %. Les membranes enrichies en cholestérol se situent dans la partie supérieure du gradient. L'isolement des radeaux sur gradient de sucrose en présence de détergent non ionique à 4°C est devenue une technique de référence pour extraire les radeaux lipidiques.

E. Les radeaux lipidiques organisent la biologie de la cellule

Les radeaux lipidiques permettent une organisation précise de la membrane. Ils rassemblent et concentrent les protéines membranaires en un seul et même endroit. Parmi les protéines enchâssées au sein des radeaux, se trouvent des protéines qui participent et induisent des voies de signalisation intracellulaire. Sous l'effet d'un stimulus, la composition protéique du radeau est modifiée ainsi que l'état de phosphorylation des protéines qui le forment. Les radeaux régulent ainsi activement la transduction du signal et sont aussi clairement impliqués dans des pathologies.

1. Les radeaux et pathologies associées

a. Réponse immunitaire

La modulation des voies de signalisation par les radeaux lipidiques a été tout d'abord observée au cours de la réponse immune (Simons and Toomre, 2000). L'exemple le plus probant est celui de la signalisation induite par la liaison de l'immunoglobuline E sur le récepteur FcεRI localisé sur les mastocytes ou les basophiles. Cette voie est impliquée au cours de la réaction allergique et conduit à une libération massive de molécules d'histamine de la part des mastocytes. Les radeaux organisent et participent à la voie de signalisation suite à la liaison de l'IgE et de son récepteur. En effet, la déplétion de cholestérol par des drogues comme la Methyl-β-cyclodextrine abolit complètement cette signalisation et inhibe la réaction allergique. Le FcεRI non couplé à l'IgE n'est pas enchâssé au sein du radeau lipidique. Suite à l'interaction entre ces deux molécules, le récepteur s'associe alors étroitement aux radeaux, ce qui engendre le recrutement de molécules signalétiques de type tyrosine kinases qui permettent alors l'initiation de la réponse immunitaire.

De plus, les radeaux lipidiques sont essentiels pour la formation de la synapse immunologique (Janes et al., 2000) (Langlet et al., 2000). Le récepteur du lymphocyte T engagé avec la molécule d'histocompatibilité d'une cellule présentatrice s'associe plus étroitement au radeau lipidique. Ce phénomène permet alors d'initier les voies de signalisation propre à l'activation du TCR. Un traitement à la méthyl-β-cyclodextrine dissocie les radeaux et inhibe la voie de signalisation induite par le TCR activé (Moran and Miceli, 1998) (Xavier et al., 1998).

Les radeaux lipidiques des cellules immunitaires constituent de véritables portes d'entrée pour différents types de pathogènes. Le virus HIV infecte les cellules T grâce à la molécule CD4 du lymphocyte. Cette protéine est justement enchâssée aux radeaux (Popik et al., 2002). Le ciblage thérapeutique des radeaux constituerait une piste thérapeutique antivirale (Verma, 2009). Un régime pauvre en graisse ou enrichie en acide gras oméga 3 ainsi qu'un traitement médicinal à base de triterpènes de plante pourrait être un complément à la tri-thérapie. Ces traitements cibleraient ainsi le composant majeur des radeaux lipidiques : le cholestérol.

L'association différentielle de molécules signalétiques aux radeaux lipidiques peut engendrer des pathologies auto-immunes comme le lupus systémique érythémateux. La principale cause du lupus systémique érythémateux est la baisse de la tolérance du lymphocyte B et de la production d'auto-anticorps. Suite à l'activation du récepteur du lymphocyte B, les kinases Lyn et Lck sont toutes deux impliquées dans la transduction du signal conduisant à la production d'anticorps dirigés contre les molécules du soi. Chez les patients atteints de cette pathologie, les deux kinases sont souvent sous-exprimées et ne s'associent plus aux radeaux (Flores-Borja et al., 2005) (Jury and Kabouridis, 2004).

b. Cancer

Les radeaux pourraient participer au développement du cancer et ceci par l'intermédiaire de la cavéoline-1. Cette protéine associée au cholestérol joue un rôle différent en fonction des cancers étudiés. La cavéoline-1 est considérée comme suppresseur de tumeur dans le cancer du poumon (Bouras et al., 2004). En effet, au sein de ces cancers, son expression est diminuée. Le rétablissement de son expression bloque l'invasion tumorale, la prolifération cellulaire et active en parallèle l'apoptose de la cellule cancéreuse (Fiucci et al., 2002) (Wu et al., 2008). A contrario, les cellules cancéreuses du côlon présentent très souvent une surexpression du gène de la cavéoline-1. La surexpression de la cavéoline-1 est corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Patlolla et al., 2004). De plus, les radeaux pourraient protéger les cellules tumorales contre l'apoptose. En effet, au cours de l'apoptose, les radeaux constituent des plateformes membranaires qui concentrent les molécules impliquées au cours de l'apoptose comme le récepteur Fas (Gajate and Mollinedo, 2005) (Gajate et al., 2000). Ils permettent alors la formation et l'activation du complexe protéique aboutissant à la mort cellulaire. En effet, des études *in vitro* ont montré que certaines molécules aux propriétés anticancéreuses, comme l'edolfosine, provoquaient l'apoptose des cellules cancéreuses en plaçant le récepteur de mort cellulaire des cellules cancéreuses aux radeaux de cholestérol (Mollinedo et al.) (Gajate et al., 2009) (Xu et al., 2009). Ainsi, un tel mécanisme pourrait être mis à profit pour élaborer de nouvelles stratégies antitumorales.

c. Maladies neurogénétiques

L'association différentielle de protéines au sein des radeaux est impliquée dans plusieurs pathologies neuronales, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de parkinson ainsi que les maladies associées au prion (Michel and Bakovic, 2007). Le plus souvent, les protéines impliquées dans ces pathologies peuvent s'associer aux radeaux lipidiques. Cette association corréle le plus souvent avec une progression accrue de la maladie neurodégénérative étudiée.

Par exemple, la principale cause de la maladie d'Alzheimer réside en la formation de plaques amyloïdes résultant de l'agrégation de peptides amyloïdes. Or, il semblerait que les protéines associées aux radeaux lipidiques des cellules situées dans la région de l'hippocampe participeraient activement à la formation des plaques séniles. En effet, il a été montré tout d'abord que l'enzyme produisant le peptide amyloïde : la γ -sécrétase, une fois activée, s'associait aux radeaux (Hur et al., 2008). De plus, dans cette même région cérébrale, l'accumulation de peptides amyloïdes a été observée (Riddell et al., 2001). Par ailleurs, une autre étude a mis en évidence des concentrations anormales de peptide amyloïdes chez les patients au sein de microdomaines lipidiques riches en

gangliosides GM1. Notamment cette étude a montré que le GM1 pouvait se lier au précurseur du peptide amyloïde ce qui accélérerait le clivage et contrôlerait les changements conformationnels de ce dernier (Hayashi et al., 2004). Ces résultats suggèrent, une fois de plus, que les radeaux lipidiques participent à la maladie d'Alzheimer en favorisant la formation de la plaque sénile (Molander-Melin et al., 2005) (Kakio et al., 2001).

Ainsi, les radeaux sont capables d'agencer et d'organiser la répartition des protéines ce qui favorise la rencontre et/ou l'interaction de protéines pouvant être impliquées dans des voies de signalisation. Les radeaux lipidiques peuvent alors être assimilés à des plateformes d'initiation de la signalisation intracellulaire et sont donc indispensables au bon fonctionnement de la cellule.

2. Organisation de l'adhérence cellulaire par les radeaux lipidiques

a. Organisation des molécules adhérentes

L'interaction entre les cellules passe par de multiples molécules d'adhérence. La localisation subcellulaire exacte de ces molécules au sein de la cellule est fondamentale pour que les cellules puissent créer entre elles des interactions fiables. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence que les radeaux pouvaient organiser la localisation des molécules d'adhérence au sein des structures adhérentes. De plus, les radeaux peuvent s'associer aux molécules du cytosquelette comme l'actine et l' α -actinine (Chichili and Rodgers, 2009). Cette observation peut constituer une autre preuve potentielle de l'association des molécules d'adhérence aux radeaux puisqu'elles sont elles-mêmes en interaction avec de telles protéines. À l'heure actuelle, la plupart des travaux ont porté entre autres sur l'analyse de la jonction serrée des cellules épithéliales. Ces études ont pu mettre en évidence que les constituants majeurs des jonctions serrées comme l'occludine, les Claudines-1, 3, 4, 7, JAM-A et ZO-1 s'associaient aux radeaux lipidiques (Nusrat et al., 2000b) (Lambert et al., 2007). De plus, les radeaux lipidiques participent activement à la biologie de la jonction serrée puisque l'association des protéines de la jonction serrée aux radeaux régule la perméabilité para-cellulaire. En effet, suite à un traitement visant à déstabiliser les radeaux, la claudine perd sa localisation habituelle. Ce phénomène corrèle avec une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Lambert et al., 2007).

En parallèle, des études ont montré que les radeaux pouvaient organiser les molécules des jonctions adhérentes comme la N-cadhérine des cellules myoblastiques (Causeret et al., 2005). Dans ce modèle cellulaire, les radeaux stabilisent la N-cadhérine à la membrane et favorisent ainsi l'interaction intercellulaire. De plus, la caténine p120 s'associe préférentiellement à la N-cadhérine

enchassée aux radeaux (Taulet et al., 2009). La formation de ce complexe assure alors une stabilité accrue de la cadhérine à la membrane. Le rôle clé des radeaux lipidiques dans l'organisation des molécules d'adhérence à la membrane a été mis également en évidence au cours du processus de fusion des cellules myogéniques (Mukai et al., 2009). En effet, les radeaux permettent de concentrer les molécules d'adhérence comme la M-cadhérine à l'extrémité du lamellipode de la cellule. Cette structure représente un site membranaire favorable à l'interaction cellulaire. Les radeaux lipidiques seraient alors des régulateurs de l'adhérence intercellulaire. Ils permettraient de concentrer et de rapprocher physiquement les molécules d'adhérence afin qu'elles établissent des interactions.

b. Organisation des molécules d'adhérence endothéliales

Bien que le rôle des radeaux lipidiques dans l'organisation des molécules d'adhérence membranaires commence à être décrypté, le rôle et la fonction spécifique des radeaux lipidiques au sein des cellules endothéliales reste encore très mal caractérisé. Cependant, quelques études portant sur les radeaux lipidiques des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique ont été menées. Les résultats de ces études ont montré que certaines molécules d'adhérence pouvaient s'associer aux radeaux lipidiques, et que les radeaux lipidiques permettaient d'organiser leur localisation et jouaient un rôle certain dans la fonction biologique de ces molécules. L'équipe de McCaffrey a pu mettre ainsi en évidence que l'occludine des cellules endothéliales de cerveau de souris pouvait *in vitro* et *in vivo* s'associer aux radeaux (McCaffrey et al., 2007) (**Cf. Figure 28**). De plus, des études complémentaires ont mis en évidence que la perméabilité dépendait à la fois de la formation de structures oligomériques à base d'occludine mais surtout de l'association des occludines aux radeaux lipidiques (McCaffrey et al., 2008).

L'association des molécules de la jonction adhérente aux radeaux lipidiques n'a jamais été vraiment mise en évidence. Une étude uniquement a étudié les conséquences d'une déstabilisation des microdomaines riches en cholestérol sur l'intégrité de la jonction adhérente (Song et al., 2007). Ainsi, la VE-cadhérine et la β -caténine ont été analysées après extinction de la cavéoline-1 par siRNA. Les résultats ont montré que l'absence de cavéoline-1 régulait négativement l'expression de la VE-cadhérine et de la β -caténine ce qui entraînait une augmentation de la perméabilité para-cellulaire. Il se pourrait donc que suite à la déstabilisation des radeaux provoquée par l'extinction de la cavéoline-1, la VE-cadhérine soit également chassée de ces microdomaines. Néanmoins, une analyse plus précise et plus fine de la composition des radeaux lipidiques de ces cellules aurait pu clairement trancher sur la possible association des molécules de la jonction adhérente aux radeaux. Il serait ainsi intéressant d'analyser cet aspect et

de déterminer si les radeaux peuvent organiser les molécules d'adhérence au sein des jonctions adhérentes.

Les résultats obtenus sur l'analyse des molécules de la jonction serrée prouvent que les radeaux lipidiques des cellules endothéliales organisent les contacts intercellulaires en concentrant les molécules d'adhérence. Ce mécanisme permettrait ainsi de renforcer les contacts entre les cellules. Cependant, aucune preuve tangible n'a été ainsi mise en évidence quant à l'association des molécules de la jonction adhérente aux radeaux lipidiques. Une partie de mon travail de thèse a consisté à analyser cette possible association.

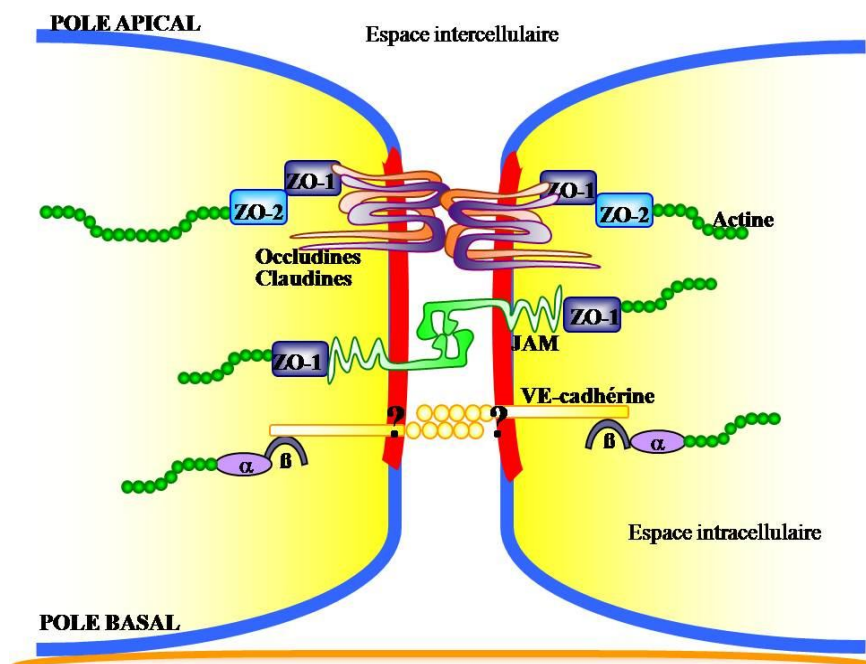


Figure 28 : Organisation des molécules d'adhérence endothéliales par les radeaux lipidiques

(D'après (Dodelet-Devillers et al., 2009))

Les radeaux lipidiques (en rouge) organisent la localisation et la fonction des molécules de la jonction serrée comme les occludine et les claudines. Ces molécules sont reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des molécules ZO-1 et -2. Les molécules JAM sont des protéines d'adhérences également enchassées dans les radeaux. Les radeaux pourraient potentiellement organiser la localisation de la VE-cadhérine. Cette cadhérine est reliée au cytosquelette d'actine par la β -caténine et l' α -caténine. Des études complémentaires permettraient de répondre à cette hypothèse.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. Étude du rôle de la N- et de la VE-cadhérine dans l'endothelium.

A. Analyse de la localisation différentielle de la N- et de la VE-cadhérine

1. Contexte scientifique

La N-cadhérine et la VE-cadhérine sont les deux cadhérines classiques endothéliales les plus abondantes dans l'endothelium. Bien que possédant toutes deux les mêmes caractéristiques globales que les cadhérines classiques, les deux cadhérines endothéliales se distinguent par leur localisation différente et par leur fonction spécifique au sein de l'endothelium vasculaire. En effet, contrairement à la N-cadhérine non-endothéliale ou bien aux autres cadhérines classiques, la localisation de la N-cadhérine endothéliale est diffuse. Par ailleurs, le rôle de la VE-cadhérine est maintenant bien caractérisé dans la biologie de la cellule endothéliale, notamment au cours de l'angiogenèse. Le rôle exact de la N-cadhérine dans l'endothelium, surtout pendant l'angiogenèse, reste controversé. En effet, bien que la plupart des études convergent vers le rôle prépondérant de la N-cadhérine dans le recrutement péricytaire, le phénotype de la souris déficiente spécifiquement pour la N-cadhérine endothéliale reste inexpliqué. Ainsi, la localisation différentielle des deux cadhérines pourrait être une signature spécifique de la cellule endothéliale, et engendrerait des rôles différents pour chacune des cadhérines. Dans un premier temps, l'étude des modèles hétérologues ont permis de pointer du doigt le rôle dominant de la VE-cadhérine dans l'organisation de la N-cadhérine (Jaggi et al., 2002) (Navarro et al., 1998). Ainsi la VE-cadhérine est la molécule responsable de la localisation originale de la N-cadhérine. Au vu de ces observations, de nombreuses questions se posent. Comment la VE-cadhérine peut ainsi modifier la localisation de la N-cadhérine? Quel est le mécanisme qui permet la ségrégation physique au niveau de la membrane des deux molécules d'adhérence? L'organisation des molécules de cadhérine à la membrane permet d'établir le contact entre deux cellules et forme ainsi la jonction adhérente. Cette étape est cruciale pour établir un lien physique entre deux cellules. Bien que les mécanismes qui régissent cette organisation soient d'une extrême complexité, l'association des cadhérines aux partenaires cytoplasmiques préférentiels comme les caténines représente un phénomène fondamental pour l'export des cadhérines aux membranes, et pour le maintien des cadhérines à la jonction. La caténine p120 semblerait être une molécule candidate de choix. Elle possède en effet un rôle très polyvalent dans la biogénèse de la

cadhérine classique. Elle pourrait contrôler le trafic membranaire de la cadhérine néo-synthétisée (Mary et al., 2002) (Chen et al., 2003), mais également jouer un rôle clé dans l'endocytose qui pourrait alors aboutir, soit à une dégradation, soit à un recyclage protéique de la cadhérine (Davis et al., 2003) (Peifer and Yap, 2003) (Xiao et al., 2003). De cette manière, p120 régulerait la localisation, et la quantité de cadhérine à la jonction.

Les radeaux sont des microdomaines connus pour organiser les molécules d'adhérences, et notamment la N-cadherine des cellules myoblastiques C2C12 (Causeret et al., 2005; Taulet et al., 2009). De plus, il a été montré que ces microdomaines participent activement à la stabilité de la cadherine à la membrane cellulaire, au niveau de la jonction. Nous avons ainsi voulu analyser une possible association des cadhérines jonctionnelle aux radeaux lipidiques. Ainsi, en absence de VE-cadherine, la N-cadherine jonctionnelle pourrait-elle s'associer préférentiellement à ces microdomaines de cholestérol connus pour stabiliser les cadhérines à la jonction? En parallèle, nous avons essayé d'étudier et de caractériser quelque particularité des cadhérines associées aux radeaux, en particulier pour le cas de la VE-cadherine. L'ensemble de ces résultats fait partie intégrante de la publication soumise à *Experimental Cell Research*. Des résultats complémentaires à cette publication sont ajoutés à la fin de cette partie.

2. Principaux résultats

Nous avons étudié la localisation des deux cadhérines dans des modèles cellulaires endothéliaux *in vitro*, et dans un modèle d'angiogenèse *in vitro*. Dans un premier temps, la localisation de la N- et de la VE-cadherine a été étudiée dans une lignée de cellules endothéliales immortalisées issue d'embryons de souris déficients en VE-cadherine. Cette lignée nous a été fournie suite à une collaboration avec le laboratoire de D. Vestweber (Max Planck Institute for Vascular Biology, Münster, Allemagne). En outre, la localisation a été analysée dans des cellules de veines de cordons ombilicaux (HUVEC). Puis nous avons également étudié les localisations respectives des deux cadhérines au sein d'un modèle d'angiogenèse *in vitro* basé sur la différenciation de cellules souches embryonnaires de souris et dans l'embryon à 9,5 jours de développement. En parallèle, et ceci pour chacun des modèles étudiés, nous avons comparé ces résultats aux résultats obtenus en absence de VE-cadherine. Ainsi, de manière générale, la localisation de la N-cadherine semble dépendre de la VE-cadherine. De plus, bien que la N-cadherine des EB déficients en VE-cadherine soit jonctionnelle, elle ne favorise pas la formation de bourgeons endothéliaux. Ce résultat suggère donc que, contrairement à la VE-cadherine, la N-cadherine participe différemment à l'angiogenèse. Une association différentielle de la N-cadherine jonctionnelle aux caténines n'a pu être observée. Ceci suggère que la N-cadherine jonctionnelle, ou non, est associée de la même manière au cytosquelette d'actine. Néanmoins, dans l'embryon, la

relocalisation jonctionnelle de la N-cadhérine n'a pu être mise en évidence. En effet, nous n'avons pas observé de marquage N-cadhérine à ce stade de développement. Également, nous nous sommes penchés sur le décryptage du mécanisme de régulation de la localisation de la N-cadhérine. Grâce à l'utilisation de VE-cadhérine mutées au niveau du domaine de liaison pour la caténine p120, nous avons constaté que l'association à p120 est nécessaire à l'exclusion de la jonction endothéliale de la N-cadhérine. Dans ces microdomaines liant la VE-cadhérine, p120 semble s'associer de préférence à la VE-cadhérine. Ce complexe constituerait ainsi une plateforme moléculaire renforçant la stabilité de la cadhérine à la jonction. Contrairement à la VE-cadhérine, la N-cadhérine jonctionnelle ne s'associe pas aux radeaux. Dans les cellules endothéliales, ces microdomaines semblent donc posséder des fonctions différentes dans l'organisation de l'ensemble des molécules d'adhérence, fonction constatée dans des cellules épithéliales polarisées.

3. Article: Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells : a key role for p120-catenin.

Alice Gentil-dit-Maurin, Stella Oun, Sébastien Almagro, Stéphanie Bouillot, Ruth Linnepe, Dietmar Vestweber, Philippe Huber, Emmanuelle Tillet

Unraveling the distinct distributions of VE- and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin

Alice Gentil-dit-Maurin ^{a,b,c}, Stella Oun ^{a,b,c,d}, Sébastien Almagro ^{a,b,c}, Stéphanie Bouillot ^{a,b,c}, Marie Courçon ^{a,b,c}, Ruth Linnepe ^e, Dietmar Vestweber ^e, Philippe Huber ^{a,b,c}, Emmanuelle Tillet ^{a,b,c,#}

^aINSERM, U882, F-38054 Grenoble France. ^b CEA, iRTSV, Laboratoire d'angiogenèse et physiopathologie vasculaire. ^c Université Joseph Fourier, F-38054 Grenoble France.

^d Present address: Department of Microbiology and Molecular Medicine, Centre Médical Universitaire, University of Geneva, Switzerland

^e Max-Planck Institute of Molecular Medicine, D-48149 Münster, Germany

[#]Corresponding author: Emmanuelle Tillet, Laboratoire APV, iRTSV CEA Grenoble, 17 rue des Martyrs 38 054 Grenoble cedex 09, France.

Tel: (33) 4-38-78-44-74. FAX: (33) 4-38-78-49-64 E-mail: emmanuelle.tillet@cea.fr

Abstract

Endothelial cells express two different classical cadherins, vascular endothelial (VE) cadherin and neural (N)-cadherin, having distinct functions in the vascular system. VE-cadherin is specific to endothelial adherens junctions and is strictly necessary for vascular morphogenesis. On the contrary, N-cadherin shows diffuse localization on the cell surface and interacts with mural cells for vessel stabilization. In this study we sought to clarify the cellular mechanisms leading to the distinct cellular locations and functions of the two cadherins in the endothelium. VE-cadherin has been shown to be responsible for junctional exclusion of N-cadherin. Using several endothelial models, we demonstrate that this property is dependent on VE-cadherin binding to p120 catenin (p120^{ctn}). Moreover, although in the absence of VE-cadherin N-cadherin can localize to cell contacts, angiogenesis remains impaired, demonstrating that endothelial junction formation is not sufficient for normal vessel development. Interestingly, we show that VE-cadherin, but not N-cadherin, is partially associated with cholesterol-enriched microdomains. Lipid raft-associated-VE-cadherin is characterized by a very high level of p120^{ctn} association, and this association is necessary for VE-cadherin recruitment into lipid rafts. Altogether, our results indicate a critical role for p120^{ctn} in regulating the membrane distribution of endothelial cadherins with functional consequences in terms of cadherin stabilization and intracellular signaling.

Key words: endothelial cells, VE-cadherin, N-cadherin, cell junctions, p120^{ctn}, cholesterol rafts

Introduction

Cadherins are homophilic cell-cell adhesion molecules essential for the organization of cells into tissues during embryonic development. Cadherins are also involved in cell growth, migration and differentiation. They are essential components of adherens junctions and bind to catenins, members of the armadillo family, which are connected to the actin cytoskeleton thus forming a functional cadherin complex. Endothelial cells express two classical cadherins, N- and VE-cadherins, playing distinct roles in vascular development. VE-cadherin is required for vascular morphogenesis during development as shown through the phenotype observed following targeted disruption of this gene in mice: severe vascular defects leading to embryonic mortality at mid-gestation (Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999). The precise role of N-cadherin during vascular development is more elusive. N-cadherin displays an unusual nonjunctional distribution in endothelium while it is concentrated at cell-cell contact sites in most other cell types where it is expressed (Leach et al., 1993; Navarro et al., 1998; Salomon et al., 1992). This extrajunctional localization is thought to be involved in interaction between endothelial and mural cells (Gerhardt and Betsholtz, 2003; Tillet et al., 2005). The mechanism underlying the junctional exclusion of N-cadherin has been previously studied by ectopic expression in non-endothelial cell lines such as Chinese hamster ovary cells (Navarro et al., 1998) or epithelial cells (Jaggi et al., 2002). Using these models, a critical role has been attributed to VE-cadherin in the exclusion of N-cadherin from cell-cell contacts. However, evidence for a similar mechanism is still lacking in more physiological conditions, either in endothelial cells, or *in vivo*. Furthermore, the mechanism of exclusion remains largely unknown. We thus decided to readdress the question of endothelial cadherin distribution using several endothelial models in which VE-cadherin expression has been knocked-down. We show that N-cadherin can be targeted to cell-cell contacts in endothelial cells when VE-cadherin is down-regulated, thus demonstrating that VE-cadherin expression is directly responsible for N-cadherin exclusion in endothelial cells. Interestingly, we show that a junctional distribution of N-cadherin is not sufficient for optimal angiogenesis sprouting. This highlights the distinct functions of the two cadherins in the endothelium.

Abbreviations used: p120^{ctn}, p120 catenin; ES cells, embryonic stem cells; EB, embryoid body; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; siRNA, small interfering RNA; dpc, days postcoitum; LR, lipid rafts.

Cadherin complexes are constituted of members of the catenin family, including β -catenin, α -catenin and p120^{ctn}. Several studies revealed that, by controlling the amount of cadherin available at cell junctions for adhesion (Davis et al., 2003; Xiao et al., 2003), p120^{ctn} has a core function in regulating cadherin-mediated adhesion. p120^{ctn} binds directly to the juxtamembrane region of cadherins and may function as a cap, thus preventing cadherin interactions with endocytic membrane traffic machinery (Chiasson et al., 2009; Xiao et al., 2005). In addition to cadherin endocytosis, several studies have suggested roles for p120^{ctn} binding in cadherin trafficking and delivery to the cell membrane (Chen et al., 2003; Delva and Kowalczyk, 2009; Liu et al., 2007). Our data support a new function for p120^{ctn} in regulating the membrane distribution of cadherins. By using VE-cadherin mutants lacking the ability to bind p120^{ctn}, we demonstrate that p120^{ctn} binding to VE-cadherin is responsible for N-cadherin junctional exclusion in endothelial cells.

Lateral organization of the cell surface might also control cadherin function, and increasing evidence suggests that cholesterol-enriched micro-domains, or lipid rafts, organize cell-cell contacts by stabilizing cadherins at the cell junction (Causeret et al., 2005; Seveau et al., 2004). In order to investigate the membrane micro-environment of endothelial cadherins, we analyzed the subcellular distribution of both VE- and N- cadherins in lipid fractions. We were able to demonstrate that endothelial N-cadherin, unlike that of myoblasts, is not associated with lipid rafts. This is true even when it is visualized at cell-cell contacts in VE-cadherin-deficient cells. On the contrary, a small portion of VE-cadherin was associated to membrane rafts. Strikingly, a very high level of p120^{ctn} was associated with VE-cadherin within lipid rafts, suggesting that VE-cadherin is highly stabilized in these distinct micro-domains. Finally, we show that a VE-cadherin mutant, lacking the ability to bind to p120^{ctn} is no more recruited into lipid rafts. Altogether, our data indicate that p120^{ctn} plays a critical role in organizing endothelial cadherin on the cell surface. The mechanisms involved not only exclude N-cadherin from junctional structures, but also result in targeting of VE-cadherin to specific membrane micro-domains from where it may mediate specific intracellular signaling.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies

Monoclonal rat anti-mouse CD31 (Mec 13.3) was a gift from Dr A Vecchi (Vecchi et al., 1994). Rat anti-mouse VE-cadherin, clone 32 mouse anti-N-cadherin and anti-flotillin-2 were from BD Pharmingen (Los Angeles, CA). 3B9 mouse anti-N-cadherin from Zymed was used for N-cadherin immunoprecipitation. Rabbit antibody against a recombinant fragment of human VE-cadherin was a gift from D. Gulino (Grenoble, France). A rabbit antibody against a C-terminal peptide of VE-cadherin has been generated according to Breier et al. (Breier et al., 1996). Mouse anti- β -catenin, g-catenin and caveolin-1 antibodies were from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Anti-p120^{ctn} was from upstate biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY). Myc antibody was from Santa Cruz Biotechnology. Anti-transferrin receptor is from Abcam. The secondary antibodies coupled with Alexa 488 were purchased from Invitrogen, and those coupled with Cyanine 3 and Cyanine 5 were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, Pennsylvania). Peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Biorad laboratories (Hercules, CA).

Cell culture

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were isolated according to previously described protocols (Lampugnani et al., 1992). They were cultured in M199 supplemented with 20% fetal calf serum (FCS), 2% LSGS (Cascade Biologics, Portland, OR) and antibiotics. Alternatively, they were cultured in Endothelial-Basal-Medium (EBM-2, Cambrex) supplemented as recommended by the manufacturer.

VE-cadherin deficient endothelioma cells (VE^{-/-} cells) were derived from homozygous VE-cadherin^{-/-} mouse embryos (Gory-Faure et al., 1999) after immortalization by polyoma middle T antigen as already described (Balconi et al., 2000). They were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 1% non essential aminoacids, 2 ng/mL of VEGF (peprotech, Rocky Hill, NJ) and FGF2 (generous gift from Dr Andrew Baird, La Jolla, CA).

The isolation of mouse embryonic stem (ES) cell line CJ7 (Swiatek and Gridley, 1993) and VE-cadherin null ES cells (Vittet et al., 1997) has been already described. ES cells were routinely cultured on gelatin-coated tissue culture dishes in the presence of 1000 Units/ml recombinant Leukemia inhibitory factor (LIF) (ESGRO, Chemicon, Temecula, CA) according to previously described procedures (Feraud and Vittet, 2003). To initiate ES cell differentiation, ES cells were seeded into a semi-solid methyl cellulose gel in the presence of angiogenic factors as described (Feraud et al., 2001). Resulting embryoid bodies (EBs) were harvested at indicated days. To analyze angiogenic sprouting, 11-day-old EBs were embedded into a collagen I gel supplemented with growth factors and further cultured for 3 days (Feraud et al., 2001; Feraud et al., 2003). The sprouting EBs were then processed for immunofluorescence.

Plasmid constructs and cell transfection

Murine VE-cadherin cDNA (coding aminoacid (aa) 1-783) has been inserted into the pcDNA3.1 hygro mammalian expression vector (Invitrogen). Two mutant forms were designed as follows: (1) A truncated mutant (VE-cad-DB-cat) lacking aa 701-783, which correspond to β -catenin binding region and (2) a chimeric cadherin mutant (N-cadEC-VE-cadIC), comprising the N-cadherin extracellular domain (aa 1-714) fused to the transmembrane and intracellular part of VE-cadherin (aa 593-783). Myc epitope has been added by PCR at the C-terminal end of all molecules to facilitate recombinant protein detection. Human VE-cadherin was cloned into pcDNA3.1 in fusion with the fluorescent protein DsRed dimer in C-terminus to generate pcDNA3.1-DsRed construct. Site-directed mutagenesis was carried out using site-directed mutagenesis Stratagene kit to introduce a triple alanine substitution on aminoacids E⁶⁵²-D⁶⁵⁴ (hVE-cadherin Dp120-DsRed). Alternatively, the same constructs (human VE-cadh and hVE-cad Dp120) were further subcloned into pcDNA3.1 myc-his in order to remove the DsRed tail of the fusion protein. All constructs have been verified by sequencing (Genome Express, Grenoble, France).

Mouse VE^{-/-} cells were transfected by Effectene (Qiagen) and CHO cells using Exgen 500 (Euromedex) according to the manufacturer protocol.

RNA interference

For RNA interference of VE-cadherin expression, the following siRNAs from Dharmacon were used: 5'-GGAACCAGAUGCACAUUGA-3' and 5'-UGACGUGGAUUACGACUUC-3' as an equimolar mixture of both. For negative control, an siRNA was used that does not target any known mammalian gene (5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3'). HUVECs were transfected with 1.6 μ g siRNA using nucleofection (Amaxa Biosystems) according to manufacturer's instructions. Cells were used 24 to 48 h after transfection.

Immunofluorescence staining

Collagen gels containing EBs were processed for immunofluorescence according to previously described procedures (Tillet et al., 2005). Cells in culture were fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized by 0.2% triton X-100 for 5 min, and stained using standard procedure with appropriate primary and secondary antibodies. Alternatively, cells were incubated in 1% triton X-100 in 10 mM PIPES, pH 6.8, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose or 5 min at 4°C, prior to fixation in 3% paraformaldehyde (in PBS), and then stained for N- or VE-cadherin. To visualize cellular ganglioside GM1, 2 μ g/ml of biotinylated cholera toxin B subunit (CTX-B, Sigma-Aldrich)

was incubated on cells for 20 min at 4°C. CTX-B was revealed using FITC-conjugated streptavidin (Molecular Probes). Stained cells were observed with a Zeiss epifluorescence microscope (Axioplan).

Isolation of DRM fractions

The well-characterized procedure for caveolae and raft membrane isolation based on their resistance to triton X-100 solubilization and flotation on sucrose gradient was used.

Three confluent 10-cm dishes of endothelial cells (HUVECs or mouse VE^{-/-} cells) were washed in PBS with Ca²⁺, Mg²⁺ and lysed in 1.5 ml ice-cooled buffer containing 50 mM Hepes pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 1% triton X-100 and a protease inhibitor cocktail (Roche) on ice for one hour. After a brief centrifugation at 2500 g for 10 min, lysates were adjusted to 40% sucrose, placed on the top of a 5-30% sucrose gradient and centrifuged at 4°C for 17 h at 40,000 rpm. Twelve 1-ml fractions were collected from the top and analyzed by immunoblotting or subjected to immunoprecipitation.

Western blotting

EBs were collected and lysed according to previously described procedures (Tillet et al., 2005). Protein concentration of the lysates was determined with a Micro-BCA kit (Pierce, Rockford, IL) using BSA as standard. Protein extracts were then separated by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), transferred onto Hybond ECL membrane (Amersham Biosciences, Saclay, France) and revealed with the appropriate antibody using standard procedures. Band intensities were quantified using image J software.

Immunoprecipitation

Cells were lysed by a 30 min incubation on ice in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4 containing 1 mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% triton X-100, 0.5 % Nonidet P-40, and a protease inhibitor cocktail (Roche). 400 µg of cell lysates were preadsorbed with 50 µl of protein G-Sepharose (Amersham) for 1 hour at 4°C and then incubated overnight at 4°C with anti-VE- or N-cadherin antibodies. 40 µl of protein G-sepharose was then added and incubated for 1 h at 4°C. Beads were washed three times with lysis buffer and immunoprecipitated proteins were dissociated by addition of Laemmli buffer containing 20% of β-mercaptoethanol, prior to analysis by western blotting with the appropriate antibody.

RESULTS

VE-cadherin excludes N-cadherin from cell junctions in endothelial cells

Although expression levels for N- and VE-cadherin are similar, N-cadherin is poorly clustered at intercellular junctions and mostly displays diffuse patterning on the endothelial cell surface. Previous work has shown that VE-cadherin can cause N-cadherin to be excluded from junctional sites in transfected non-endothelial cell lines (Navarro et al., 1998). However, Luo et al. (Luo and Radice, 2005) suggested a more significant function for N-cadherin on endothelial cells. These authors also demonstrated a role for N-cadherin in cell-cell contacts, to some extent. Therefore, we attempted to clarify the localization of N-cadherin in endothelial cells and to identify the role played by VE-cadherin in excluding N-cadherin from cell-cell junctions in several endothelial models. As expected, we observed a mainly diffuse staining pattern for N-cadherin on the cell surface of HUVECs (figure 1A, upper panel) and only rarely detected it at cell-cell contacts (see x-z or y-z sections in fig.1A). In order to identify the contribution of VE-cadherin to N-cadherin junctional exclusion we knocked-down VE-cadherin expression by siRNA and compared N-cadherin subcellular localization in cells transfected by control (figure 1A, center panel) or VE-cadherin (figure 1A, lower panel) siRNAs. Down regulation of VE-cadherin expression by si-RNA greatly enhanced N-cadherin location at cell contacts (as shown by the white arrow) compared to control siRNA counterpart. Similar observations could be made on polyoma middle T-immortalized endothelioma cells established from VE-cadherin-deficient embryos (VE^{-/-} cells). Although these cells did not form a homogeneous cell layer like HUVECs, N-cadherin was clearly observed at cell contacts (figure 1B, lower panel, arrow). However, when VE-cadherin expression was restored in these cells, N-cadherin mostly disappeared from cell contacts (figure 1B, upper panel, arrowheads). Taken together, these observations seem to indicate that both cadherins cannot be concomitantly expressed at endothelial cell junctions.

Junctional N-cadherin cannot promote angiogenesis

We next investigated whether the absence of VE-cadherin could influence N-cadherin location in sprouting angiogenesis. For this purpose, we used an *in vitro* model based on differentiation of ES cells. ES-derived embryoid bodies (EBs), when placed in a collagen matrix, develop a network of branching endothelial outgrowths, thus constituting a valuable model to study angiogenesis (Feraud et al., 2001; Feraud et al., 2003; Feraud and Vittet, 2003). Endothelial sprouts can be visualized by CD31 staining. VE-cadherin-deficient ES cells produced very few angiogenic outgrowths (figure 2A, left) where CD31-positive cells mostly form disorganized cell clusters. This is in contrast to the long

outgrowths developed from wild-type EBs (figure 2A, right). N-cadherin labeling showed that angiogenic outgrowths expanding from wild-type embryoid bodies were devoid of junctional N-cadherin staining whereas CD31 and VE-cadherin antibodies clearly decorated the cell periphery (figure 2B, upper panel). On the contrary, in VE-cadherin-deficient EBs, strong N-cadherin staining was observed at cell-cell contacts, displaying a similar pattern to CD31 staining (figure 2B, lower panel, arrowhead). Thus, as for endothelial cells in culture, in EBs the absence of VE-cadherin results in N-cadherin targeting to cell-cell junctions. Despite this localization, angiogenic sprouting did not develop normally in the VE-cadherin negative EBs, indicating that N-cadherin cannot replace VE-cadherin in its angiogenic functions.

VE-cadherin interaction with p120^{ctn} is required for N-cadherin exclusion from cell-cell junctions

In order to identify which molecular domains of VE-cadherin are responsible for N-cadherin exclusion from cell-cell junctions we generated different VE-cadherin mutants and transfected them into VE^{-/-} cells. The mutants generated (figure 3A) included a truncated VE-cadherin, encoding a protein lacking the β -catenin binding domain (VE-cad D β cat) and a chimeric protein composed of the extracellular (EC) domain of N-cadherin fused to the transmembrane and intracellular tail of VE-cadherin (Ncad EC/VE-cad IC). Transfection of these constructs into CHO cells lead to correct protein expression with the expected junctional location (data not shown). Moreover, as expected, co-immunoprecipitation experiments indicated that Ncad EC/VE-IC chimeric protein interacted with β -catenin and p120^{ctn} in a similar manner to the wild-type VE-cadherin; the mutant VE-cadD β -cat lacked the ability to bind β -catenin (figure 3B). As mentioned previously, when VE-cadherin was transfected into VE^{-/-} cells, N-cadherin was excluded from cell contacts (figure 3C, panel a). Similar effects were observed with the two VE-cadherin mutants: N-cadherin was mostly absent from cell junctions in cells expressing VE-cadherinD- β -cat or N-cad EC/VE-cad IC (figure 3C, panels b and c). These results indicate that the dominant activity of VE-cadherin is located neither in its EC domain nor in its β -catenin binding region. This suggests that N-cadherin exclusion by VE-cadherin is governed by the latter's proximal cytoplasmic tail. This domain contains the VE-cadherin p120^{ctn} binding site. This binding site has previously been mapped to the highly conserved sequence Y⁶⁴⁵-D⁶⁵⁴ (Ferber et al., 2002; Thoreson et al., 2000). We therefore generated a mutant in which three amino acids E⁶⁵²M⁶⁵³D⁶⁵⁴ within this motif were replaced by alanines (Dp120 mutant) (figure 3A). These three amino acids have previously been shown to be critical for p120^{ctn} binding (Calkins et al., 2003; Xiao et al., 2003). Fusions of this mutant and wild-type VE cadherin with the fluorophore DsRed facilitated detection of transfected cells using fluorescence microscopy. Figure 3B shows that both DsRed fusion proteins can bind β -catenin, however, p120^{ctn}, as expected, failed

to co-immunoprecipitate with the Dp120-DsR mutant. Upon transfection into VE^{-/-} cells, VE-cad-DsR, similarly to murine VE-cadherin, resulted in the exclusion of N-cadherin from cell-cell contacts. In striking contrast, the Dp120-DsR mutant, although exported to cell contacts, did not replace N-cadherin at junction sites, as shown by a high level of colocalization appearing as yellow on the merge image (figure 3C, panel e). Dp120-DsR is thus the only VE-cadherin mutant able to colocalize with junctional N-cadherin in VE^{-/-} cells. These results demonstrate that the VE-cadherin-mediated exclusion of N-cadherin from cell-cell junctions is dependent on the former's binding to p120^{ctn}.

Catenin association with endothelial cadherins

Following these observations, we examined whether the localization of cadherins at the cell surface was correlated with differential catenin binding. For this, we immunoprecipitated VE- and N-cadherins from HUVECs transfected with control or VE-cadherin siRNAs. Western blotting was used to analyze the presence of catenins in the cadherin complex. The efficiency of VE-cadherin knock-down was approximately 80-90%, as shown in figure 4A, and VE-cadherin extinction had no effect on cellular N-cadherin expression levels. We show that N-cadherin and VE-cadherin associated with β -catenin, α -catenin and g-catenin to similar extents, despite their differing subcellular localizations (figure 4B –C). However, a much higher level of p120^{ctn} was associated with VE-cadherin compared to N-cadherin. Moreover, the knock-down of VE-cadherin, inducing the translocation of N-cadherin to cell junctions, did not increase the level of p120^{ctn} association with N-cadherin (figure 4C). We then examined the total amount of p120^{ctn} available after VE-cadherin knock-down (fig. 4A). No decrease in p120^{ctn} content was observed after VE-cadherin down-regulation, that could explain the lack of p120 association to N-cadherin in VE-cadherin knocked down cells. Hence, endothelial cadherins can be distinguished through their p120^{ctn} binding capacity.

Cadherin association with lipid rafts in endothelial cells

In myoblasts the N-cadherin–catenin complex has been found to localize to lipid raft microdomains. This association was required for the establishment of a functional cadherin adhesive complex. We therefore analyzed the rate of participation of both endothelial cadherins in this type of structure, that might be correlated with junction formation. A first approach was to analyze the colocalization of known raft markers with endothelial cadherins. To visualize lipid rafts on our cells we used cholera-toxin B (CTX-B). CTX-B binds to ganglioside GM1, a membrane-component of lipid rafts. As shown in figure 5A, CTX-B labeling was diffuse and appeared as a punctuate staining

not associated with cell contacts in endothelial cells. Lipid rafts are characterized by their resistance to detergent solubilization. By stripping the cells with cold 1% triton X-100 before fixation and labeling (pre-perm), we were able to detect faint CTX-B labeling at cell contacts (figure 5B, arrow). This staining partially colocalized with VE-cadherin (figure 5B, merge in white). It is worth noting that following triton extraction, VE-cadherin remains at cell-cell contacts as a sharp staining, while N-cadherin was almost completely extracted (data not shown). These observations indicate that some lipid rafts are localized at the sites of endothelial junctions and may contain cadherins.

To analyze endothelial cadherin contribution to lipid rafts more quantitatively, we submitted triton X-100 HUVEC lysates to separation on sucrose density gradients. Detergent resistant membranes (DRMs) can be isolated by flotation on such gradients (Iwabuchi et al., 1998) and the protein profile associated with these DRMs can then be analyzed by western blotting with appropriate antibodies. HUVEC protein extracts were analyzed following gradient fractionation. Transferrin receptor, a protein commonly used as a non-lipid raft marker (Harder et al., 1998), was found in fractions 10-12. Conversely, fractions 3-5 contained 2 markers of lipid rafts, flotillin and caveolin-1 (figure 6A). Protein content analysis of all gradient fractions indicated that most of the proteins were in fractions 10-12, whereas fewer proteins were recovered in fractions 3-5 (data not shown). Analysis of cadherin distribution showed that VE-cadherin was mainly found in the non-lipid raft fractions. However, a minor proportion of the protein was located in the upper fractions, thus associated with lipids. This lipid raft-associated amount was estimated to be 3% of total VE-cadherin. On the other hand, N-cadherin was totally recovered in the detergent-soluble fractions and no signal could be detected in lipid raft fractions (figure 6A). Thus, in endothelial cells, while a small proportion of VE-cadherin is found associated with lipid rafts, N-cadherin is completely excluded from these membrane micro-domains.

We then analyzed if N-cadherin translocation to cell junctions could be correlated with an association with lipid rafts. Lysates from cells transfected with control siRNA or VE-cadherin siRNA were fractionated on sucrose gradients. Fractions 3-5 and fractions 10-12 were pooled and called, respectively, lipid rafts (LR) and non-lipid rafts (NLR) fractions. The presence of cadherins was analyzed in these fractions (figure 6B). N-cadherin could not be detected in LR fractions in either condition. This is in contrast to VE-cadherin, which was present in both LR and NLR fractions. This result indicates that, in the absence of VE-cadherin, while N-cadherin is translocated to cell junctions this does not result in or from an association with lipid rafts.

Lipid raft-associated VE-cadherin preferentially binds to p120 catenin compared to detergent-soluble VE-cadherin

We next wished to investigate whether the two different pools of VE-cadherin, LR- vs. NLR-associated, showed different binding capacities for known intracellular partners. For this, VE-cadherin was immunoprecipitated from LR and NLR fractions and its association with catenin was analyzed by western blotting. VE-cadherin from LR or NLR pools similarly bound to α -catenin and β -catenin (figure 7A). γ catenin was also examined, because it had been shown that this catenin is critical for endothelial barrier maintenance, in association with VE-cadherin and the vascular endothelial protein tyrosine phosphatase VE-PTP (Nottebaum et al., 2008). However, similarly to α and β -catenin, no increase in VE-cadherin- γ catenin association was observed in lipid rafts (figure 7A). On the contrary, we show that VE-cadherin from LR exhibited a much higher rate of association with p120^{ctn} than NLR-associated VE-cadherin (figure 7B). The ratio of p120^{ctn} associated with raft-VE-cadherin was estimated to be 30 times that of the NLR pool as shown by densitometric measurement of western blot band intensities. Thus, raft-associated VE-cadherin is linked to p120^{ctn} in significantly greater amounts than its non-raft counterpart.

p120 catenin interaction is necessary for VE-cadherin association with lipid rafts

In order to analyze whether VE-cadherin binding to p120^{ctn} is required for lipid rafts association of VE-cadherin, we transfected mouse VE^{-/-} cells with a human VE-cadherin mutant lacking the ability to bind p120^{ctn} (hVE-cadDp120). For this purpose, we generated a construct missing the large DsRed tail from the previously used fusion protein (figure 4) because we realized that this large tag interfered with a correct total export to cell membrane. After transfection with wild-type or Dp120-VE-cadherin, cells were lysed and fractionated on sucrose gradient as described for HUVECs. Rafts or soluble proteins were analyzed by western blotting (figure 8A). Our results indicate that only wild type VE-cadherin is detected in substantial amounts in the LR fraction. As control, flotillin was identically revealed in rafts extracted from WT VE-cadherin or Dp120-VE-cadherin transfected cells. In addition, figure 8B confirms that both VE-cadherin molecules are targeted to cell contacts, but only wild-type VE-cadherin recruits p120^{ctn} at cell contacts. Thus, only in this latter case, VE-cadherin is indeed enriched in lipid rafts fractions.

Discussion

Other reports have pointed out the unusual distribution of N-cadherin in the endothelium, compared to other tissues (Navarro et al., 1998; Salomon et al., 1992). N-cadherin is able to participate to junctional structures, in several cell types, including cardiac myocytes, but in

endothelial cells, it remains diffusely distributed at the cell surface. N-cadherin junctional exclusion has been studied in non-endothelial cell models. Navarro et al. (Navarro et al., 1998) showed that VE-cadherin was able to displace N-cadherin from adherens junctions in CHO cells. In contrast, other authors showed that VE-cadherin expression did not affect the localization of other classical cadherins, such as E-cadherin, in epithelial cells (Jaggi et al., 2002). In this study, we are the first to characterize the subcellular distribution of N-cadherin in VE-cadherin-deficient endothelial cells using three different models. VE-cadherin knock-down induced a translocation of N-cadherin to defined cell-cell contacts, suggesting N-cadherin engagement into junctional structures. Thus, VE-cadherin is required to keep N-cadherin out of cell-cell contact regions in cultured endothelial cells. In addition, our data provide the first indications for the molecular requirements allowing VE-cadherin to exclude N-cadherin from junctional sites. Strikingly, we were able to demonstrate that association of VE-cadherin with p120^{ctn} was necessary for N-cadherin replacement at junctions. This observation was reinforced by the use of two other VE-cadherin mutants, either expressing an N-cadherin extracellular region, or lacking the previously characterized β -catenin-binding domain (Navarro et al., 1995). These were both able to displace N-cadherin from cell-cell contacts. From this we conclude that neither the extracellular domain of VE-cadherin, nor its C-terminal catenin-binding region, are required for this activity. This confirms previous work showing that association with catenin and through this, the cytoskeleton, does not play a major role in the competition between VE- and N-cadherins for junctional localization in CHO cells (Navarro et al., 1998). With this study we extended this observation to endothelial cells, and were also able to show that three amino acids (E⁶⁵²-D⁶⁵⁴) from the juxtamembrane domain of VE-cadherin are critical for N-cadherin junction exclusion. These amino acids belong to a highly conserved sequence (Y⁶⁴⁵-D⁶⁵⁴) containing the p120^{ctn} binding site (Ferber et al., 2002; Thoreson et al., 2000) and are required for efficient p120^{ctn} interaction with VE-cadherin (Calkins et al., 2003). Thus, p120^{ctn}-associated VE-cadherin can displace N-cadherin from junctional sites.

An *in vitro* angiogenesis model based on ES cell differentiation, which has previously proven its worth for studying genes involved in angiogenesis (Feraud et al., 2001; Feraud and Vittet, 2003; Tillet et al., 2005), allowed us to confirm that N-cadherin is also translocated to junctional sites in VE-cadherin-deficient angiogenic outgrowths. N-cadherin expression was found to be unable to replace VE-cadherin in the development of endothelial outgrowths, as indicated by an absence of rescue of vascular defects in VE-cadherin^{-/-} EBs. We thus conclude that the presence of endothelial junctional structures is not sufficient to support endothelial outgrowths. This observation strengthens the concept that each cadherin can trigger specific signaling, probably through interaction with different regulatory proteins that lead to specific cellular responses (Lampugnani and Dejana, 2007; Vestweber, 2008; Wallez and Huber, 2008).

Cadherins participate in adherens junctions, a highly specialized cell membrane structure that links the cell membrane to the actin cytoskeleton through cytoplasmic partners including catenins, although the mechanisms of actin-catenin-cadherin interaction are at present being thoroughly revisited (Drees et al., 2005; Gates and Peifer, 2005; Yamada et al., 2005). Cadherin complexes form a belt at cell edges that participates in mechanical resistance to distortive forces, and allows epithelial integrity to be maintained. In endothelial cells, N- and VE-cadherins bind equally to β -catenin and α -catenins. On the contrary, we have demonstrated a strong difference in p120^{ctn} binding between VE- and N-cadherins. It has been reported that p120^{ctn} regulates cadherin-mediated adhesion through its contribution to cadherin clustering, which strengthens cell-cell adhesion (Thoreson et al., 2000; Yap et al., 1998). Therefore, the weak p120^{ctn}-N-cadherin association may not be sufficient to trigger strong adhesion in the absence of VE-cadherin. Furthermore, it has been shown that p120^{ctn} is required for the maintenance of VE-cadherin expression levels (Iyer et al., 2004) by modulating cadherin delivery to degradative endocytic compartments (Xiao et al., 2003; Xiao et al., 2005). Therefore, weak p120^{ctn} binding to N-cadherin could also trigger a higher recycling turn-over. However, the level of p120^{ctn} associated with N-cadherin may depend on endothelial cell types since Ferreri et al. (Ferreri et al., 2008) showed that both N- and VE-cadherin bound p120^{ctn} at similar levels in bovine pulmonary artery cells (BPAECs). Moreover, in these cells, p120^{ctn} expression was necessary to maintain N-cadherin levels. This discrepancy with our results could be related to a much higher ratio of N-cadherin/VE-cadherin in BPAECs than in HUVECs, and a participation of N-cadherin in junction formation in BPAECs cannot be excluded.

Once delivered to the cell membrane, cadherins diffuse freely at the cell surface before engagement into contacts. Once committed to adhesive bonds with neighbouring cells, cadherins cluster and their movement becomes limited (Lambert et al., 2002; Mege et al., 2006; Thoumine et al., 2006). We thus hypothesized that, in the cell membrane, N- and VE-cadherins may have distinct mobility properties. Plasma membrane contains cholesterol/sphingolipid-enriched micro-domains that dynamically organize specific membrane proteins (Jacobson et al., 1995). These lipid rafts prevent lateral diffusion and concentrate molecules in a microenvironment of the membrane to facilitate signal transduction (Simons and Toomre, 2000). N-cadherin has been found associated with lipid rafts in myoblasts, thereby allowing its stabilization and enabling the formation of a functional adhesive complex (Causeret et al., 2005). We hence analyzed the presence of endothelial N- and VE-cadherins in lipid rafts, to examine a potential correlation between lipid raft association and junction organization. Our data showed that, although VE-cadherin appeared mostly at cell contacts, it is only weakly associated to lipid rafts (3% of total VE-cadherin). A previous study showed that annexin 2, an actin binding protein, could anchor VE-cadherin to cholesterol rafts, thereby preventing its lateral diffusion (Heyraud et al., 2008). It is worth noting that N-cadherin

could not be detected in the raft fractions, thus reinforcing the differences between endothelial cells and myoblasts for N-cadherin membrane organization.

Interestingly, we show that lipid raft-associated VE-cadherin is bound to significant amounts of p120^{ctn} (30 times greater than VE-cadherin that is not associated to LR). Moreover, using a VE-cadherin lacking the ability to bind p120^{ctn}, we show that this interaction is necessary to target VE-cadherin to lipid rafts, thus showing that p120^{ctn} association is required either to drive VE-cadherin to rafts, or to maintain the cadherin into lipid rafts.

These findings might have important functional consequences in terms of cadherin stabilization and junction formation. Indeed, since p120^{ctn} is considered to stabilize cadherins at cell junctions (Chiasson et al., 2009; Davis et al., 2003; Xiao et al., 2005), we suggest that a small part of the membrane VE-cadherin, associated with cholesterol-enriched domain and strongly bound to p120^{ctn}, has a low turn-over rate and contributes to the formation of stable mature junctions. Very recently, Taulet et al. (Taulet et al., 2009) showed a similar p120 association with N-cadherin from lipid rafts in myoblasts, suggesting that the concentration of p120/cadherin complex in cholesterol rafts could be a more general mechanism of cadherin stabilization for junction maintenance. Moreover, these micro-domains could offer a highly specialized signaling platform. As p120^{ctn}-association has been shown to correlate with the phosphorylation state of VE-cadherin (Lampugnani et al., 1997), we suggest that lipid raft-associated VE-cadherin, although it represents a minor proportion of total membrane VE-cadherin, might play a critical role in organizing signal transduction pathways in this specific area of the plasma membrane. Further studies are necessary to analyze the functional role of lipid-raft-VE-cadherin in cell signaling.

Acknowledgments

A Gentil is supported by the "ligue nationale contre le cancer, comité de l'Isère". We thank Muriel Jacquier-Sarlin and Michèle Lainé for their help in lipid rafts isolation and D. Gulino for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

References

1. Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysen, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J. M., Collen, D., and Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147-57.
2. Gory-Faure, S., Prandini, M. H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M., and Huber, P. (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **126**, 2093-102.
3. Leach, L., Clark, P., Lampugnani, M. G., Arroyo, A. G., Dejana, E., and Firth, J. A. (1993). Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J Cell Sci* **104 (Pt 4)**, 1073-81.
4. Navarro, P., Ruco, L., and Dejana, E. (1998). Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol* **140**, 1475-84.
5. Salomon, D., Ayalon, O., Patel-King, R., Hynes, R. O., and Geiger, B. (1992). Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci* **102 (Pt 1)**, 7-17.
6. Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314**, 15-23.
7. Tillet, E., Vittet, D., Feraud, O., Moore, R., Kemler, R., and Huber, P. (2005). N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Exp Cell Res* **310**, 392-400.
8. Jaggi, M., Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2002). Differential displacement of classical cadherins by VE-cadherin. *Cell Commun Adhes* **9**, 103-15.

9. Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* **163**, 525-34.
10. Xiao, K., Allison, D. F., Buckley, K. M., Kottke, M. D., Vincent, P. A., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* **163**, 535-45.
11. Chiasson, C. M., Wittich, K. B., Vincent, P. A., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2009). p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **20**, 1970-80.
12. Xiao, K., Garner, J., Buckley, K. M., Vincent, P. A., Chiasson, C. M., Dejana, E., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2005). p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell* **16**, 5141-51.
13. Chen, X., Kojima, S., Borisy, G. G., and Green, K. J. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* **163**, 547-57.
14. Delva, E., and Kowalczyk, A. P. (2009). Regulation of cadherin trafficking. *Traffic* **10**, 259-67.
15. Liu, H., Komiya, S., Shimizu, M., Fukunaga, Y., and Nagafuchi, A. (2007). Involvement of p120 carboxy-terminal domain in cadherin trafficking. *Cell Struct Funct* **32**, 127-37.
16. Causeret, M., Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., and Gauthier-Rouviere, C. (2005). N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts. *Mol Biol Cell* **16**, 2168-80.
17. Seveau, S., Bierne, H., Giroux, S., Prevost, M. C., and Cossart, P. (2004). Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol* **166**, 743-53.
18. Vecchi, A., Garlanda, C., Lampugnani, M. G., Resnati, M., Matteucci, C., Stoppacciaro, A., Schnurch, H., Risau, W., Ruco, L., Mantovani, A., and et al. (1994). Monoclonal

- antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* **63**, 247-54.
19. Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W., and Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* **87**, 630-41.
 20. Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., and Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* **118**, 1511-22.
 21. Balconi, G., Spagnuolo, R., and Dejana, E. (2000). Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: A tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1443-51.
 22. Swiatek, P. J., and Gridley, T. (1993). Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev* **7**, 2071-84.
 23. Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., and Huber, P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6273-8.
 24. Feraud, O., and Vittet, D. (2003). Murine embryonic stem cell in vitro differentiation: applications to the study of vascular development. *Histol Histopathol* **18**, 191-9.
 25. Feraud, O., Cao, Y., and Vittet, D. (2001). Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab Invest* **81**, 1669-81.
 26. Feraud, O., Prandini, M. H., and Vittet, D. (2003). Vasculogenesis and angiogenesis from in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Methods Enzymol* **365**, 214-28.
 27. Luo, Y., and Radice, G. L. (2005). N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol* **169**, 29-34.

28. Ferber, A., Yaen, C., Sarmiento, E., and Martinez, J. (2002). An octapeptide in the juxtamembrane domain of VE-cadherin is important for p120^{ctn} binding and cell proliferation. *Exp Cell Res* **274**, 35-44.
29. Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K., and Reynolds, A. B. (2000). Selective uncoupling of p120^(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* **148**, 189-202.
30. Calkins, C. C., Hoepner, B. L., Law, C. M., Novak, M. R., Setzer, S. V., Hatzfeld, M., and Kowalczyk, A. P. (2003). The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *J Biol Chem* **278**, 1774-83.
31. Iwabuchi, K., Handa, K., and Hakomori, S. (1998). Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem* **273**, 33766-73.
32. Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* **141**, 929-42.
33. Nottebaum, A. F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A. C., Linnepe, R., Polaschegg, C., Filippova, K., Lyck, R., Engelhardt, B., Kamenyeva, O., Bixel, M. G., Butz, S., and Vestweber, D. (2008). VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med* **205**, 2929-45.
34. Navarro, P., Caveda, L., Breviario, F., Mandoteanu, I., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1995). Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem* **270**, 30965-72.
35. Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (2007). Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis. *Thromb Res* **120 Suppl 2**, S1-6.
36. Vestweber, D. (2008). VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 223-32.

37. Wallez, Y., and Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 794-809.
38. Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* **123**, 903-15.
39. Gates, J., and Peifer, M. (2005). Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell* **123**, 769-72.
40. Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., and Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**, 889-901.
41. Yap, A. S., Niessen, C. M., and Gumbiner, B. M. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* **141**, 779-89.
42. Iyer, S., Ferreri, D. M., DeCocco, N. C., Minnear, F. L., and Vincent, P. A. (2004). VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1143-53.
43. Ferreri, D. M., Minnear, F. L., Yin, T., Kowalczyk, A. P., and Vincent, P. A. (2008). N-cadherin levels in endothelial cells are regulated by monolayer maturity and p120 availability. *Cell Commun Adhes* **15**, 333-49.
44. Lambert, M., Choquet, D., and Mege, R. M. (2002). Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **157**, 469-79.
45. Mege, R. M., Gavard, J., and Lambert, M. (2006). Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 541-8.
46. Thoumine, O., Lambert, M., Mege, R. M., and Choquet, D. (2006). Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol Biol Cell* **17**, 862-75.

47. Jacobson, K., Sheets, E. D., and Simson, R. (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* **268**, 1441-2.
48. Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9.
49. Heyraud, S., Jaquinod, M., Durmort, C., Dambroise, E., Concord, E., Schaal, J. P., Huber, P., and Gulino-Debrac, D. (2008). Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions. *Mol Cell Biol* **28**, 1657-68.
50. Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Charrasse, S., Bodin, S., and Gauthier-Rouviere, C. (2009). N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis. *J Biol Chem* **284**, 23137-45.
51. Lampugnani, M. G., Corada, M., Andriopoulou, P., Esser, S., Risau, W., and Dejana, E. (1997). Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci* **110 (Pt 17)**, 2065-77.

FIGURES

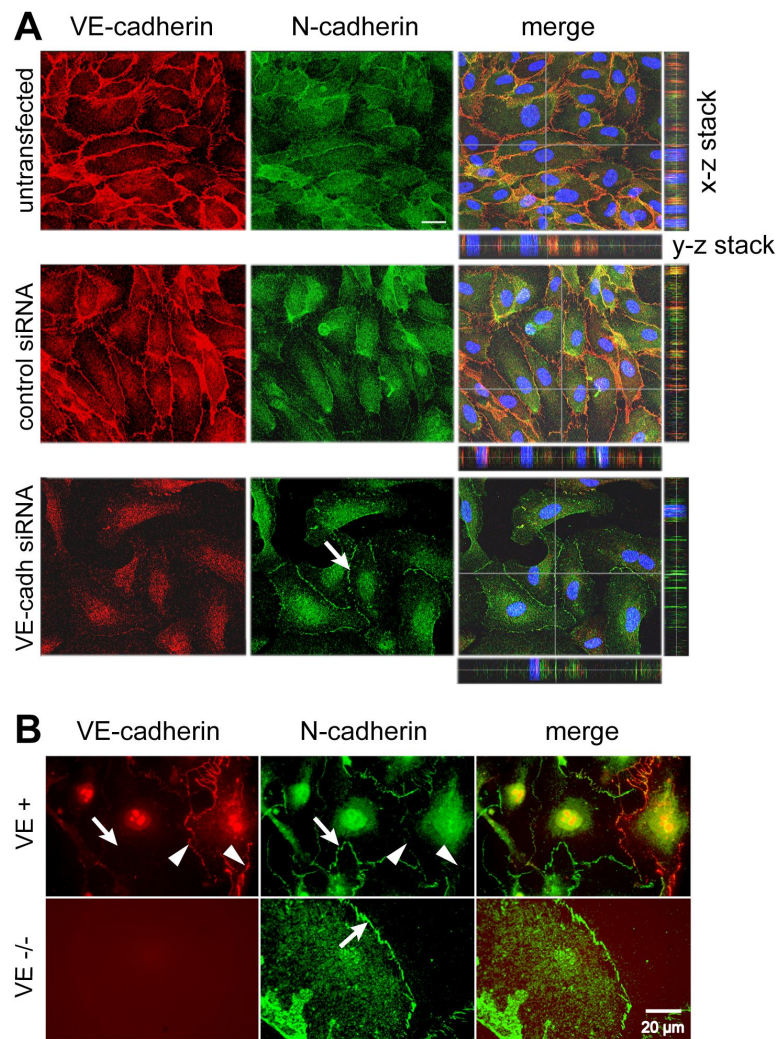


Figure 1

VE-cadherin excludes N-cadherin from endothelial cell junctions.

siRNA knock down of VE-cadherin expression in HUVECs (A) or transient transfection of mouse VE-cadherin^{-/-} (VE^{-/-}) endothelioma cells (B) followed by immunofluorescence analysis of cadherin localization in transfected cells.

HUVECs were transfected with control siRNA or with siRNA directed against VE-cadherin as indicated on the left. VE-cadherin (in red) and N-cadherin (in green) were stained 24 h after transfection using specific antibodies and observed on a confocal microscope. Z stacks are represented around the merge images (A). VE^{-/-} cells were labeled either untransfected (VE^{-/-}) or transiently transfected (VE⁺) with full length murine VE-cadherin (B). Overlay of the two images is shown (merge), with colocalization appearing as yellow. The white arrows show junctional N-cadherin, whereas arrowheads point to VE-cadherin-positive junctions devoid of N-cadherin staining. Bar : 20 μ m.

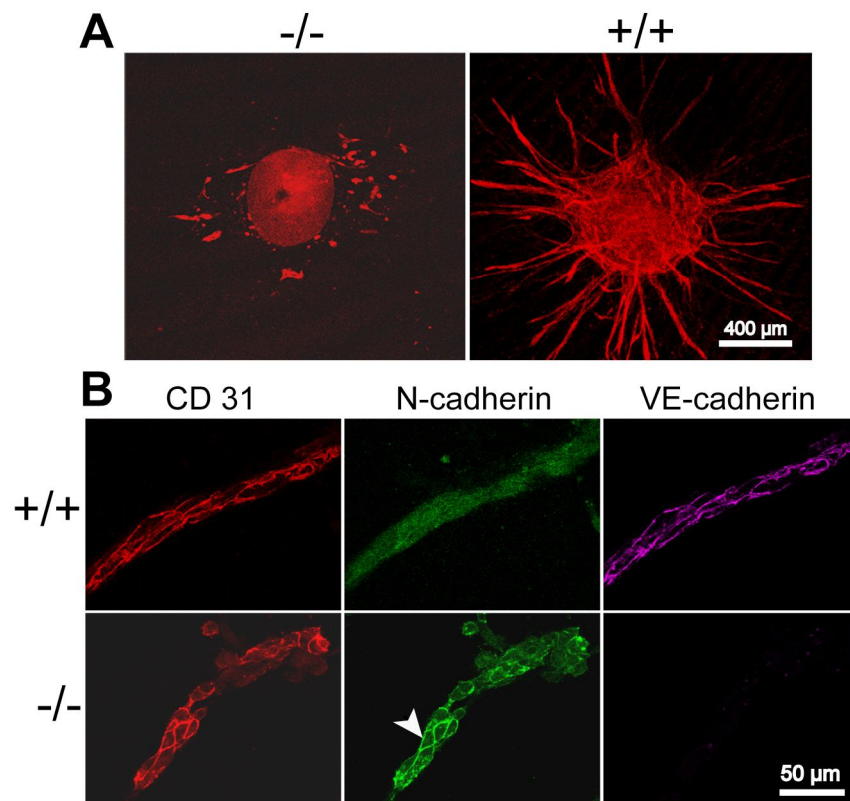


Figure 2

N-cadherin translocation to endothelial cell junctions lacking VE-cadherin is not sufficient for optimal angiogenesis sprouting.

Endothelial sprouts derived from 11-day-old embryoid bodies of wild type ($+/+$) or VE-cadherin deficient ($-/-$) genotypes were obtained after a 3 days-subculture in collagen I gel. CD31 was labeled with a Cy-3 conjugate (in red), N-cadherin with alexa-488 (in green) and VE-cadherin with Cy-5 (in purple). Observations were made with a confocal microscope under low (panel A) or high (panel B) magnification. Arrowhead points to junctional N-cadherin observed in VE-cadherin deficient endothelial sprouts.

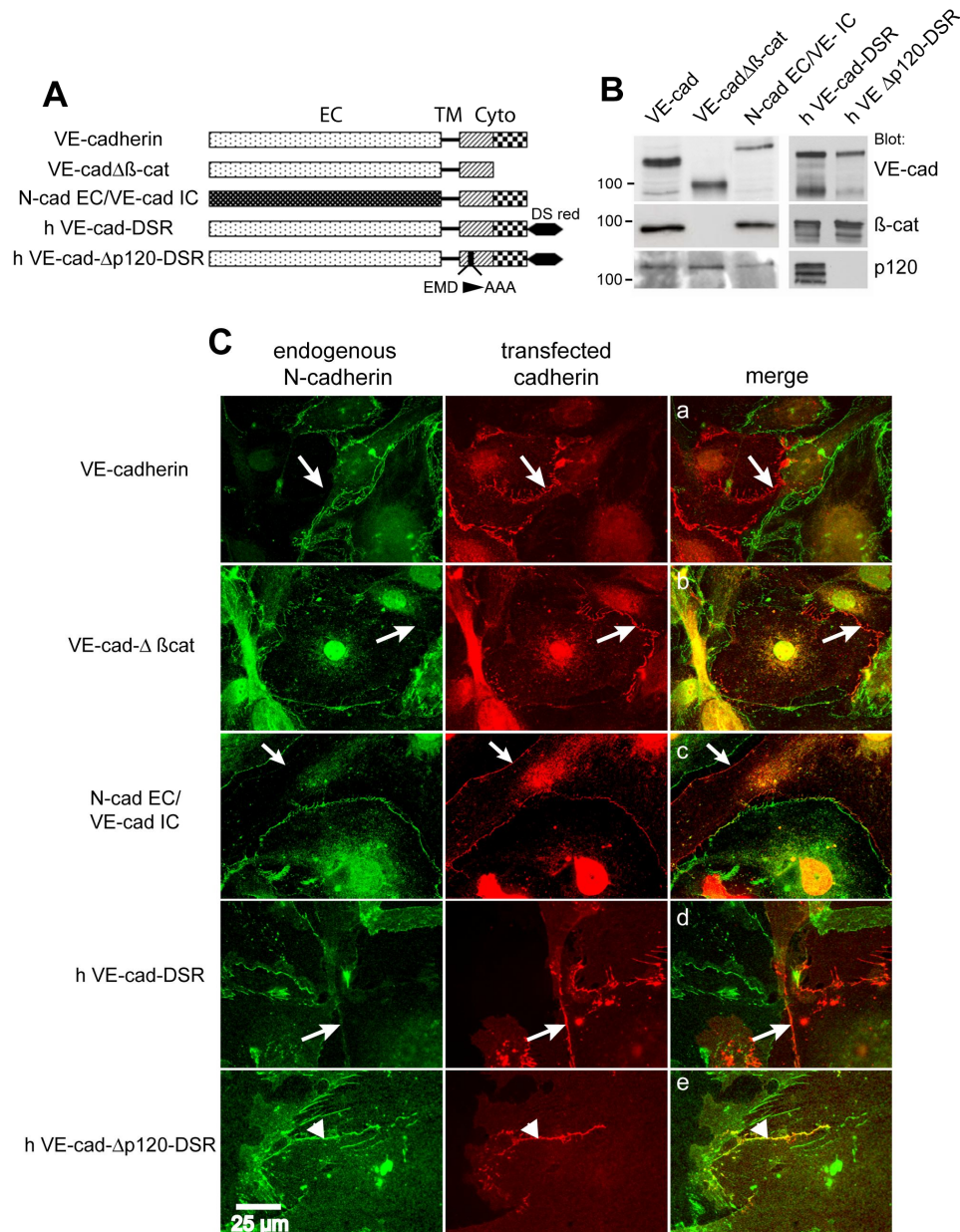


Figure 3

N-cadherin exclusion from junctions is dependent on VE-cadherin-p120 catenin interaction.

(A) Schematic representation of the different cadherin constructs used for transfection. The VE-cadherin cDNA contains the full-length wild-type murine VE-cadherin sequence. The VE-cad- $\Delta\beta$ cat construct lacks the last 83 aminoacids of the COOH terminal end. N-cad EC/VE-cad IC is a chimeric murine cDNA formed by the extracellular part of N-cadherin linked to the transmembrane and cytoplasmic tail of VE-cadherin. All three coding sequences were fused at the C-terminus to an additional sequence coding the myc epitope for protein detection. Two other constructs consist of human (h) VE-cadherin cDNA fused to Ds-red for fluorescence detection. hVE-cad-DsR encodes the wild-type human VE-cadherin while the Dp120 mutant have three aminoacids E⁶⁵²MD⁶⁵⁴ substituted to 3 alanines.

(B) Immunoprecipitation of recombinant VE-cadherin and analysis of the co-immunoprecipitated catenin by western blotting. Transiently transfected CHO cells were lysed and murine or human VE-cadherin was immunoprecipitated with the appropriate antibody (respectively anti-myc antibody or rabbit anti-human VE-cadherin). β -catenin and p120^{ctn} were further revealed from the same immunoprecipitates. As expected, VE-cad D β -cat lacks the ability to bind β -catenin while the Dp120 mutant failed to coimmunoprecipitate with p120^{ctn}. Migration of the molecular mass markers is indicated on the left (in kDa).

(C) Immunofluorescence analysis of transiently transfected VE^{-/-} endothelioma cells. Cells were double stained with antibodies against N-cadherin (left panels) and an antibody recognizing the transfected cadherin molecules (anti-VE-cadherin or anti-myc antibody; central panels). Overlays are shown (merge on the right), with colocalization appearing as yellow. Arrows point to the disappearance of N-cadherin associated with the expression of the transfected cadherin constructs. Only the hVE-cad-Dp120 mutant is able to colocalize with endogenous N-cadherin (arrowhead).

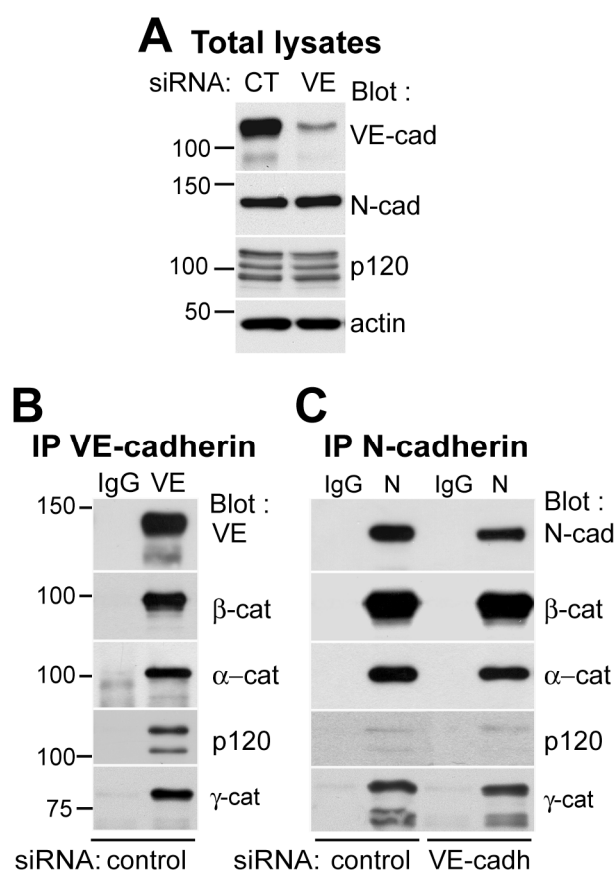


Figure 4

Catenin association to endothelial cadherins : p120 catenin poorly associates to N-cadherin compared to VE-cadherin.

VE-cadherin expression was knocked down by siRNA in HUVECs and the catenins association to junctional or non-junctional cadherin was analyzed by co-immunoprecipitation followed by western blotting. Panel A shows the efficiency of VE-cadherin extinction in total HUVEC lysates 24 h after siRNA transfection and indicates that VE-cadherin knock-down does not modify the total content of N-cadherin or p120^{ctn} proteins. Actin is revealed as loading control. Lysates were immunoprecipitated (IP) with normal IgG, rabbit VE-cadherin antibody (B) or goat N-cadherin antibody (C).

Co-immunoprecipitated proteins were detected by western blotting with specific antibodies as indicated on the right. Migration of the molecular mass markers is indicated on the left (in kDa).

β -catenin, α -catenin and γ -catenin were both coimmunoprecipitated with either anti-cadherin antibodies, but p120^{ctn} catenin was only slightly detected in N-cadherin immunoprecipitates.

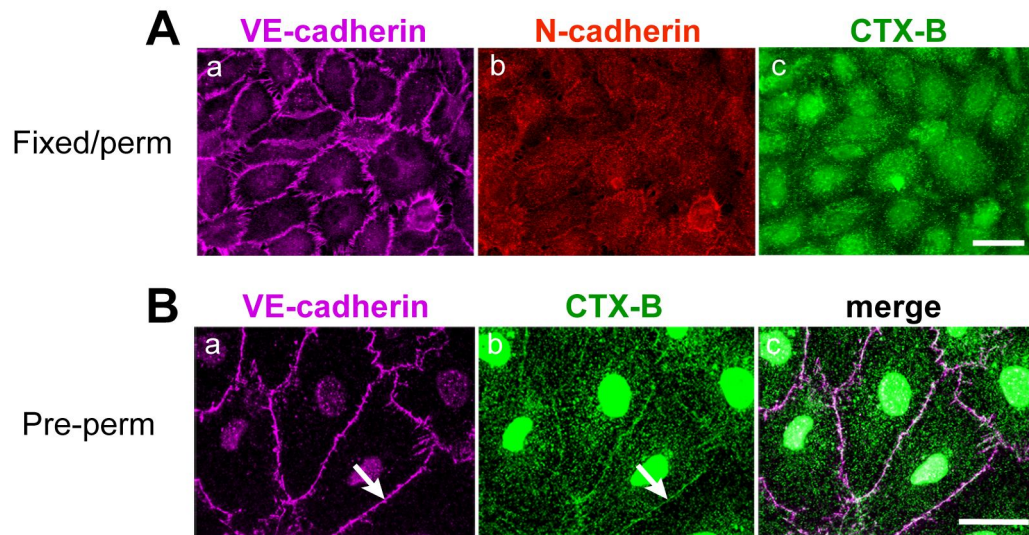


Figure 5

Partial localization of cholesterol-enriched lipid rafts at cell junctions.

Ganglioside GM1 distribution was analyzed by treatment with biotinylated cholera toxin-B (CTX-B) detected with streptavidin-FITC, and colocalization with cadherins was visualized by immunofluorescence. Cells were fixed either before (fixed/perm, A) or after (pre-perm, B) extraction with cold 1% triton-X100 and stained with antibodies to cadherins. VE-cadherin was labeled with a cyanine-5 conjugated antibody (purple) and N-cadherin is in red. CTX-B exhibited a diffuse localization and was not concentrated to cell-cell contacts (fixed/perm, A). A small proportion of CTX-B could be observed at the cell junctions and only when cells were first extracted with cold triton (B, see arrow). Bar : 20 μ m

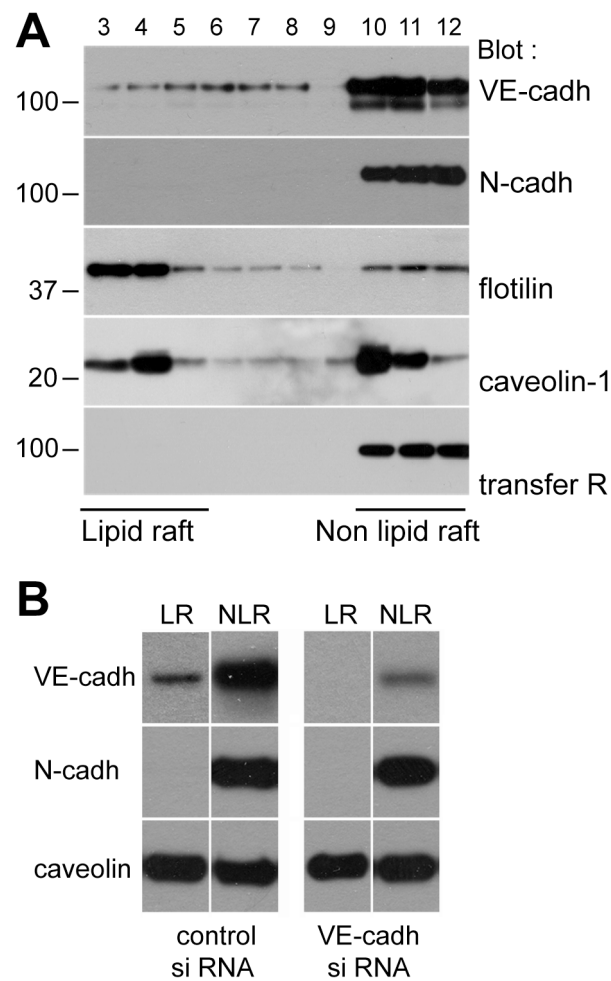


Figure 6

VE-cadherin, but not N-cadherin, partially associates with lipid rafts.

(A) Confluent HUVECs were lysed in 1% triton X-100 and separated on sucrose gradients. Fractions from 3 to 12 were analyzed for VE-cadherin and N-cadherin distribution by immunoblotting. Caveolin and flotillin were used as markers of lipid rafts (fractions 3 to 5), while transferrin receptor, known to be exclusively located outside of lipid rafts, was located in fractions 10 to 12.

(B) HUVECs were transfected with control siRNA or VE-cadherin siRNA and membranes were fractionated as described in (A). Pooled lipid rafts (LR, fractions 3-5) or non lipid rafts (NLR, fraction 10-12) were analyzed for the presence of VE- or N-cadherin by immunoblotting. Caveolin was revealed as a control of LR fractionation.

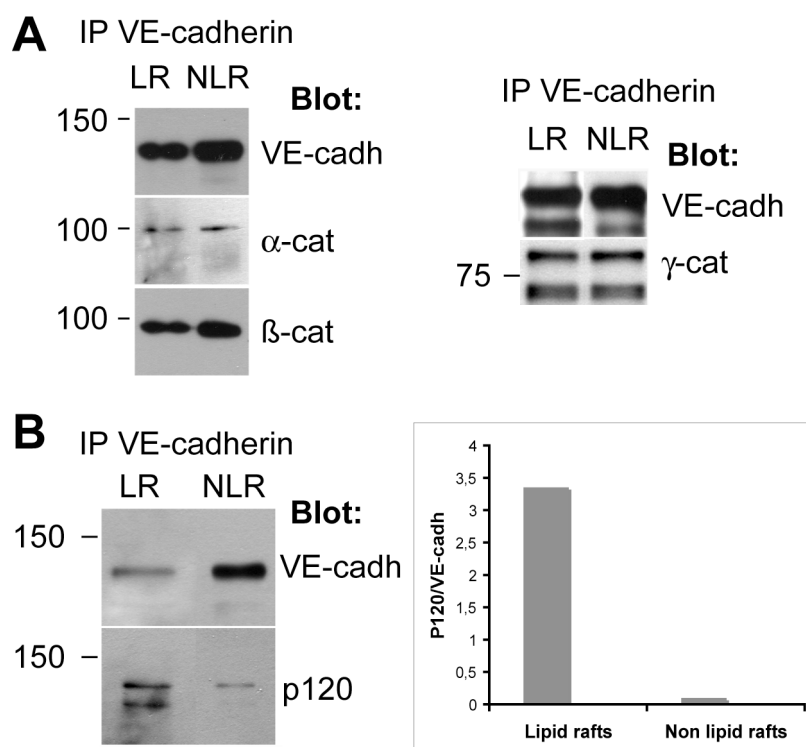


Figure 7

VE-cadherin from lipid raft associates preferentially to p120 catenin.

VE-cadherin was immunoprecipitated from isolated DRMs (fractions 3-5, LR) and from triton X-100 soluble fractions (fraction 10-12, NLR). Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and revealed by western-blotting with α -catenin and β -catenin or γ catenin antibodies (A), and p120^{ctn} antibody (B). Histogram shows the ratio of p120^{ctn}/VE-cadherin (B) based on the densitometric analysis of band intensities in LR and NLR fractions.

Equal amounts of α and β and γ catenins were associated with VE-cadherin from lipid raft (LR) or non lipid raft (NLR) but p120^{ctn} preferentially associated to LR VE-cadherin.

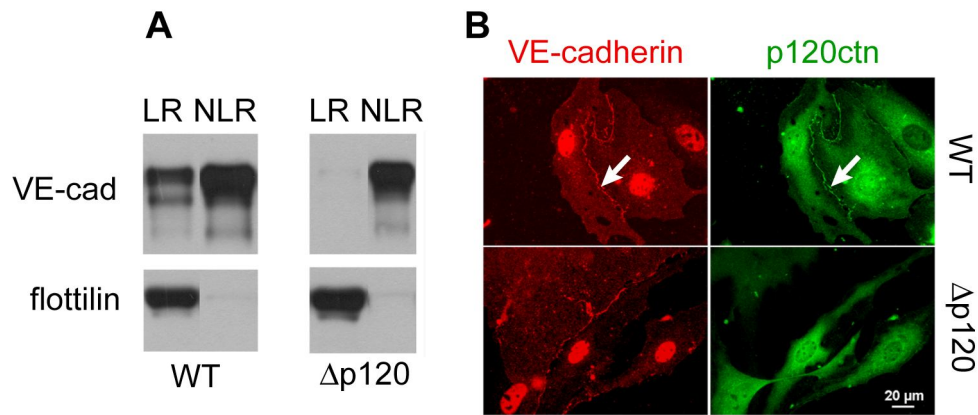


Figure 8

P120^{ctn} association is required for VE-cadherin recruitment into lipid rafts.

VE^{-/-} endothelioma cells were transfected with wild type human VE-cadherin (WT) or with a VE-cadherin mutant lacking the ability to bind p120^{ctn} (h VE-cad-Dp120).

24h after transfection, cells were lysed in 1% triton X-100 and separated on sucrose gradients (A). Pooled lipid rafts (LR, fractions 3-5) or non lipid rafts (NLR, fraction 10-12) were analyzed for the presence of VE-cadherin. Flotillin was revealed as a control of LR fractionation.

B panel shows immunofluorescence images of transfected cells labeled with VE-cadherin antibodies (in red) or p120^{ctn} antibodies (in green). White arrows point to cell contacts where wild type VE-cadherin recruits p120^{ctn} (a, b). The Dp120 mutant p120^{ctn} (c,d) fails to concentrate at cell contacts (d).

4. Résultats complémentaires de l'article

a. Analyse de la N-cadhérine des cellules endothéliales.

◆ Partenaires associés

La VE-cadhérine et la N-cadhérine peuvent interagir avec des partenaires cytoplasmiques. Ces deux molécules ont des partenaires communs comme l' α - et la β -caténine. En effet, ces molécules se lient de manière équivalente aux deux cadhérines. Une association différentielle pour un partenaire particulier pourrait constituer une piste de recherche permettant de comprendre les fonctions spécifiques et les différences de la N- et de la VE-cadhérine dans l'endothelium. Ainsi des immunoprécipitats de la N- et de la VE-cadhérine ont été réalisés. La β -caténine, p120 et SHP-2 ont été ensuite détectées au sein des immunoprécipitats (**Cf. Figure 29 A et B**). SHP-2 a été ainsi analysée puisque cette phosphatase joue un rôle stabilisateur des cadhérines à la jonction (Leonard et al., 2008). Comme attendus, les résultats montrent une association équivalente de la N- et de la VE-cadhérine à la β -caténine. En effet, l'intensité des bandes correspondant à la β -caténine est de même intensité au sein des deux immunoprécipitats (**Cf. Figure 29 B**). SHP-2 semble suivre la même voie que p120 puisqu'elle n'est pas détectée dans l'immunoprécipitat de la N-cadhérine (**Cf. Figure 29**). Des études ultérieures ont montré que l'association accrue de SHP-2 à la N-cadhérine régula et stabilisait la N-cadhérine aux jonctions adhérentes pendant la différenciation des cellules de rétines (Leonard et al., 2008). En tenant compte de ces résultats, et des résultats obtenus dans la Figure 31, la localisation diffuse de la N-cadhérine des cellules endothéliales pourrait être également due à l'absence d'association entre la N-cadhérine et SHP-2. Si SHP-2 régule effectivement la localisation jonctionnelle de la cadhérine endothéliale, la localisation jonctionnelle de la N-cadhérine suite à une régulation négative de l'expression de la VE-cadhérine par technique siRNA, pourrait être attribuée à une association plus importante avec SHP-2. Ainsi, des immunoprécipitations de la N-cadhérine dans des cellules déficientes en VE-cadhérine ont été réalisées. Malheureusement, en raison de problèmes techniques, aucun résultat interprétable n'a pu être observé.

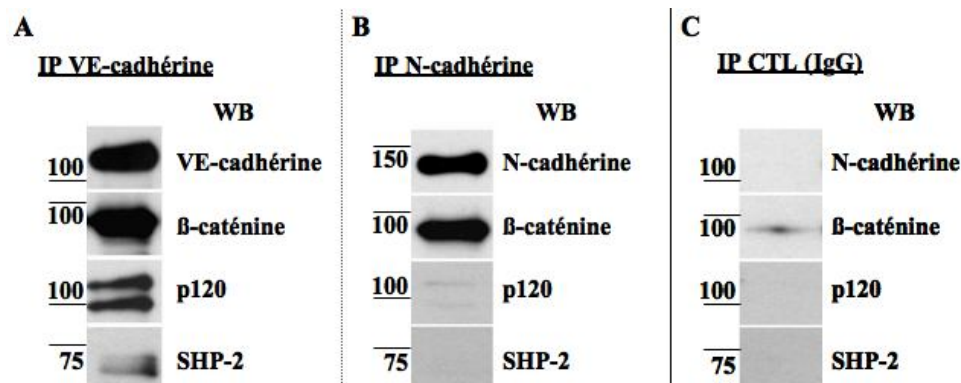


Figure 29 : P120 et SHP-2 s'associent préférentiellement avec la VE-cadherine.

Les cellules HUVECs ont été lysées puis les protéines ont été dosées. 300 µg de protéines ont été immunoprécipitées (IP) par un anticorps anti-VE-cadherine (A), ou par un anticorps anti-N-cadherine (B). L'immunoprécipitation par des immunoglobulines non spécifiques (IP IgG) constitue le témoin négatif (C). Les protéines des immunoprécipitats ont été par la suite séparées sur gel et analysées en western blot (WB). L'association de la VE-cadherine ou de la N-cadherine avec la β-caténine, p120 et SHP-2 a été détectée grâce à des anticorps spécifiquement dirigés contre ces protéines.

◇ Conséquence de l'extinction de la N-cadherine

Suite à la mise en évidence du rôle clé de la VE-cadherine dans l'exclusion jonctionnelle de la N-cadherine, nous nous sommes intéressés à la réciproque, c'est-à-dire à savoir si la N-cadherine était aussi capable de contrôler l'organisation de la VE-cadherine. Nous avons ainsi analysé les conséquences de l'extinction de la N-cadherine par stratégie siRNA dans des cellules HUVECs. Tout d'abord, le taux de protéine correspondant à la N- et de la VE-cadherine suite au traitement au siRNA a été étudié en western-blot (Cf. **Figure 30 B**). Contrairement au traitement au siRNA contrôle, le siRNA dirigé contre la N-cadherine inhibe l'expression de la N-cadherine dans sa quasi-totalité. De plus, l'intensité de la bande correspondant à la VE-cadherine est la même dans les deux conditions. Ceci montre que suite à la diminution de la quantité de N-cadherine, l'expression de la VE-cadherine ne semble pas être affectée. De la même manière, l'inhibition de l'expression de la VE-cadherine suite à un traitement au siRNA VE-cadherine, n'affecte pas l'expression de la N-cadherine (Cf. **Figure 30 B**).

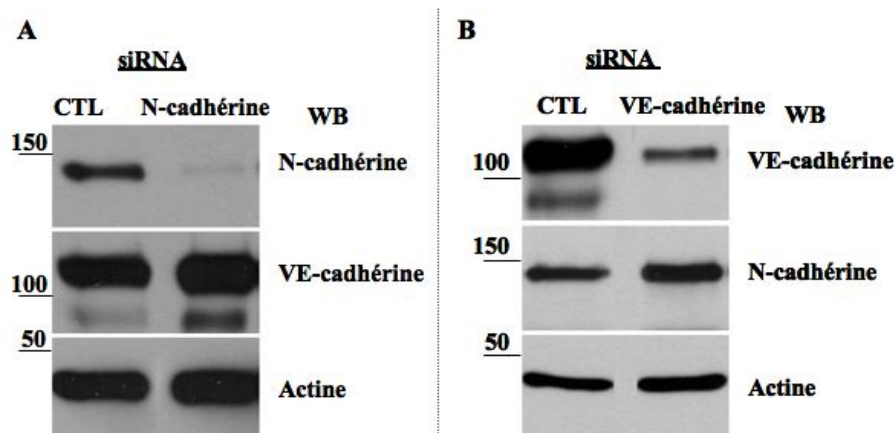


Figure 30 : L'extinction de la N- ou de la VE-cadhérine ne modifie pas l'expression des deux cadhérines.

Les cellules HUVECs ont été nucléofectées soit par un siRNA CTL ou dirigé contre la N-cadhérine (1 μ M de siRNA) (1). En parallèle, les HUVECs ont été nucléofectées soit par un siRNA CTL ou dirigé contre la VE-cadhérine (1 μ M de siRNA) (2). 24 heures après la nucléofection, les cellules ont été lysées et 5 μ g de protéines ont été séparées par western-blot (WB) puis révélées avec un anticorps anti-VE-cadhérine, anti-N-cadhérine ou anti-actine. La quantité de protéines a été normalisée par la détection de l'actine.

Puis, la localisation des deux cadhérines a été analysée suite au traitement au siRNA N-cadhérine (**Cf. Figure 31**). La localisation des deux cadhérines a été comparée à celle des cellules traitées au siRNA VE-cadhérine (**Cf. Figure 31 A**). Ainsi, les cellules traitées au siRNA N-cadhérine perdent l'expression de cette cadhérine, puisque l'intensité de marquage de la N-cadhérine est fortement diminuée (**Cf. Figure 31 B**). De plus, bien qu'en absence de VE-cadhérine la localisation de la N-cadhérine soit modifiée (voir flèche blanche Figure 31 A), l'inhibition de l'expression de la N-cadhérine n'affecte pas la localisation de la VE-cadhérine. La VE-cadhérine présente toujours une localisation subcellulaire interendothéliale. Ceci montre clairement que la N-cadhérine n'organise pas la localisation de la VE-cadhérine et que seule la VE-cadhérine possède un pouvoir d'exclusion jonctionnelle.

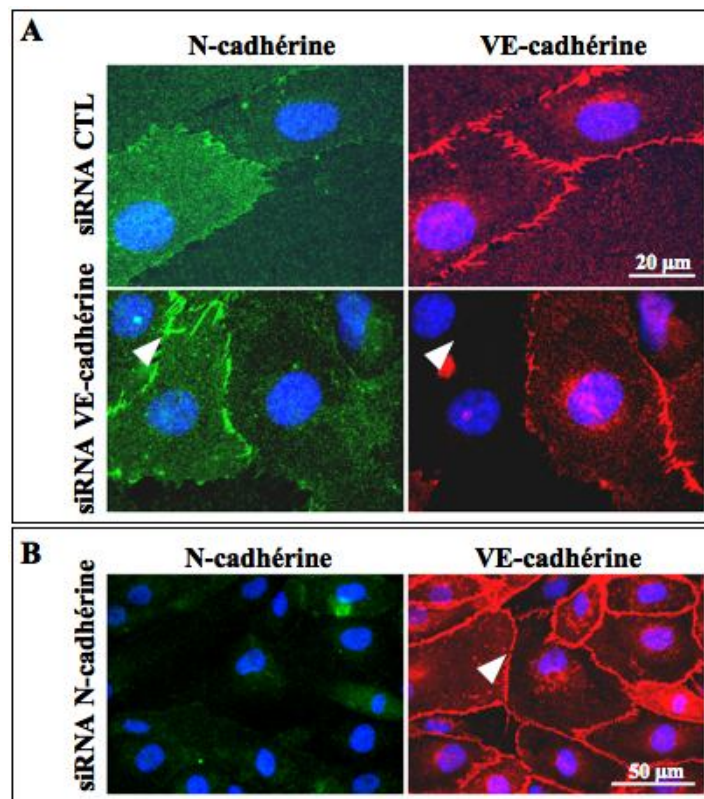


Figure 31 : Contrairement à la régulation de la localisation de la N-cadhérine par la VE-cadhérine, la N-cadhérine n'organise pas la localisation de la VE-cadhérine

Les cellules HUVECs ont été nucléofectées dans un premier temps par un siRNA CTL, ensuite par un siRNA dirigé contre la VE-cadhérine (1μM de siRNA) (A), et enfin par un siRNA dirigé contre la N-cadhérine (B). 24 heures après la nucléofection les cellules sont fixées, perméabilisées, puis co-marquées par des anticorps anti-VE-cadhérine et anti-N-cadhérine. Enfin leurs noyaux sont colorés au bleu de Hoechst avant d'être observé au microscope à épifluorescence.

Ainsi, parmi la N- et la VE-cadhérine, la VE-cadhérine est la seule cadhérine endothéliale qui puisse modifier la localisation de la N-cadhérine, sans affecter l'expression de la cadhérine neurale. Ces résultats montrent une fois de plus le rôle clé de la VE-cadhérine au sein de l'endothélium.

b. Analyse des radeaux lipidiques des cellules endothéliales

Les radeaux lipidiques forment des plateformes moléculaires capables d'organiser structurellement et fonctionnellement la jonction intercellulaire grâce leur association aux molécules d'adhérence. Cependant, peu de choses sont connues concernant les radeaux lipidiques des cellules endothéliales. En effet, très peu d'études ont porté sur l'analyse de la composition du radeau lipidique endothélial. Nous avons ainsi voulu étudier dans un premier temps l'organisation du radeau lipidique au sein des cellules endothéliales grâce à l'analyse de protéines et de lipides connus pour faire partie intégrante du radeau. Nous avons ainsi analysé la localisation du ganglioside GM1 et la cavéoline-1 au sein des cellules endothéliales (Cf. **Figure 32**) traités ou non avec une solution perméabilisante contenant 1% de triton X-100.

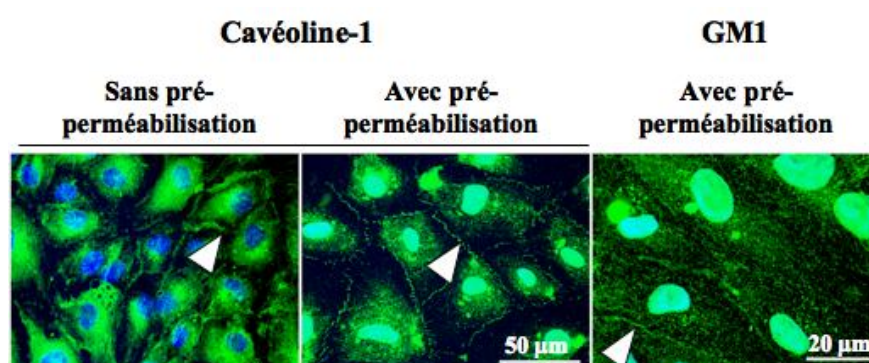


Figure 32 : Les radeaux lipidiques des cellules endothéliales se concentrent au niveau des contacts intercellulaires

Les HUVECs ont été fixées, perméabilisées, et prétraitées avec une solution contenant 1% de Triton X-100. Ces cellules ont été par la suite marquées avec un anticorps anti-Cavéoline. La localisation du ganglioside GM1 a été étudiée dans des cellules HUVECs pré-perméabilisées avec une solution de triton X-100 puis fixées. Elles sont par la suite marquées à la toxine de choléra couplée au FITC. Leurs noyaux sont colorés au bleu de Hoechst avant d'être observé au microscope à épifluorescence.

Ce traitement a pour action de solubiliser et extraire les protéines présentes en dehors des radeaux de cholestérol. Suite à ce traitement, il ne reste que les protéines associées aux radeaux lipidiques. Les HUVECs expriment la cavéoline-1 qui est en partie localisée au niveau des contacts interendothéliaux (Cf. **Figure 32 pré-perméabilisation et fixation**). Ce marqueur protéique des radeaux est donc localisé au niveau de la jonction interendothéliale. Même si, sur ce cliché le ganglioside GM1 présente un marquage également jonctionnel (Cf. **Figure 32 GM1**), sur

l'ensemble des cellules observées il est assez difficile d'obtenir une aussi belle localisation jonctionnelle. Ces résultats indiqueraient donc que des radeaux lipidiques des cellules endothéliales peuvent se concentrer aux jonctions interendothéliales mais probablement en faible quantité.

c. Analyse des radeaux lipidiques épithéliaux.

En parallèle de l'analyse des radeaux lipidiques des cellules endothéliales, nous avons analysé les radeaux lipidiques des cellules épithéliales. En effet, comme dit précédemment, il était assez difficile de mettre en évidence la localisation jonctionnelle des radeaux endothéliaux. Nous avons voulu alors comparer cette colocalisation à celle des cellules épithéliales. Notre choix de modèle cellulaire épithélial s'est tourné vers les cellules épithéliales rénales canines extraites par Madin et Dardy (ou MDCK). Ces cellules sont fortement polarisées puisqu'elles possèdent un niveau d'organisation baso-apicale très marqué. Elles constituent alors un modèle de système jonctionnel épithélial de choix. La localisation des marqueurs de radeaux comme la flotilline-2 et la cavéoline-1 ainsi que la localisation de la β - et de la γ -caténine a été effectuée et analysée (**Cf. Figure 33**). Tout d'abord, le marquage immunofluorescent pour la flotilline-2 s'observe aux contacts inter-épithéliaux (voir **Cf. Figure 33 A**). Un tel marquage est également visible pour le ganglioside GM1 suite à un traitement pré-perméabilisant (**Cf. Figure 33 B**). Comme attendu, la localisation de la β - et la γ -caténine s'observe également à la jonction que les cellules soient traitées ou non avec la solution pré-perméabilisante (voir Figure 33 : flèches blanches à pointillés noirs et flèches blanches à damier). De plus, les deux marqueurs protéiques des radeaux colocalisent relativement les caténines analysées.

Ainsi, de manière plus marquée que pour les cellules endothéliales, les radeaux de cholestérol des cellules MDCK se trouvent en partie à la jonction inter-épithéliale et colocalisent avec les molécules des jonctions adhérentes. De plus, contrairement aux radeaux épithéliaux, les radeaux des cellules endothéliales semblent être moins abondants.

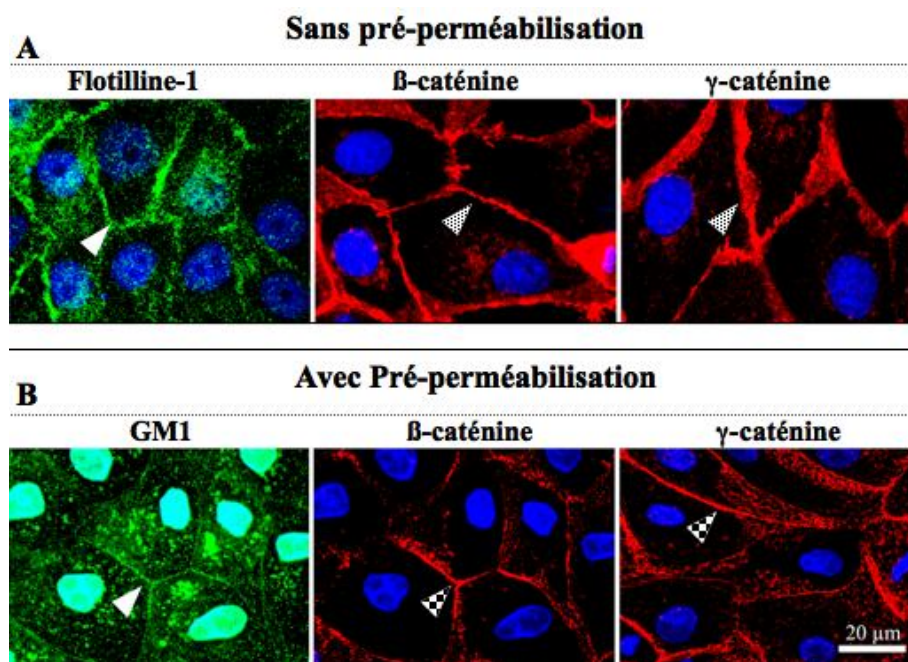


Figure 33 : Les molécules de la jonction adhérente des cellules épithéliales (MDCK) colocalisent avec des marqueurs des radeaux lipidiques.

Les HUVECs ont été soit fixées puis perméabilisées et marquées avec un anticorps anti-flotilline (A) soit pré-perméabilisées par une solution contenant 1% de triton X-100 puis fixées. Le ganglioside GM1 a été détecté grâce à la toxine B du choléra (CTxB) couplée au FITC (B). Les HUVECs ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-flotilline ou avec un anticorps anti- β - ou anti- γ -caténine. Leurs noyaux sont colorés au bleu de Hoechst avant d'être observé au microscope à épifluorescence.

d. Analyse de la VE-cadhérine des radeaux de cholestérol

Notre étude a permis de mettre en évidence que seule une petite fraction de la VE-cadhérine pouvait s'associer aux radeaux. Nous avons ainsi analysé cette fraction limitée de VE-cadhérine associée aux radeaux. Tout d'abord, nous avons testé l'association spécifique de la VE-cadhérine aux radeaux de cholestérol grâce au traitement par une drogue visant à déstabiliser les radeaux. Puis, afin de souligner une spécificité particulière de cette molécule d'adhérence au radeau lipidique, son profil de phosphorylation a été comparé à celui de la VE-cadhérine non associée au radeau.

◆ Spécificité d'association

Suite à l'analyse en western-blot des différentes fractions obtenues à partir d'un gradient de sucrose, nous avons mis en évidence qu'une petite fraction de la VE-cadhérine était enchâssée aux radeaux lipidiques. Afin de montrer la spécificité de cette association, nous avons traité les HUVECs avec des drogues qui déstabilisent les radeaux de cholestérol. La première drogue choisie fut le cholestérol oxydase (ou CO). Cette molécule est une flavoprotéine transformant le cholestérol en cholesténone par un processus d'oxydation. Le cholestérol oxydé n'est ainsi plus capable de maintenir la structure du radeau lipidique. La localisation de la VE-cadhérine a été ainsi mise en évidence suite au traitement à la CO. Le marquage dirigé contre la VE-cadhérine traitée ou non à la CO reste toujours au niveau des contacts interendothéliaux (Cf. **Figure 34**). Il semble donc que le CO ne perturbe pas la localisation de la VE-cadhérine. Ces résultats n'ont rien de surprenant puisqu'une petite fraction de VE-cadhérine est associée aux radeaux lipidiques. La technique d'immunofluorescence ne semble pas être la méthode la plus adaptée pour analyser le déplacement du pool restreint de VE-cadhérine associée aux radeaux suite à un tel traitement.

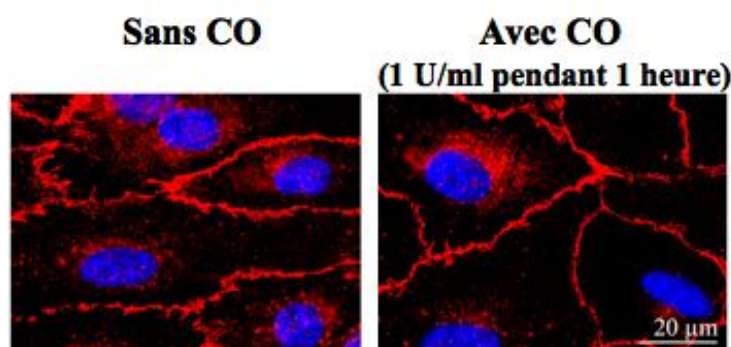


Figure 34 : Le traitement au cholestérol oxydase ne perturbe pas la localisation de la VE-cadhérine

Les HUVECs ont été traitées ou non par du cholestérol oxydase (CO). Ces cellules ont été fixées puis perméabilisées. Les HUVECs ont été par la suite marquées avec un anticorps anti-VE-cadhérine. Leurs noyaux sont colorés au bleu de Hoechst avant d'être observés au microscope à épifluorescence.

Des résultats similaires en immunofluorescence ont été obtenus suite à un traitement avec une autre drogue connue pour déstabiliser les radeaux de cholestérol: la Méthyl- β -cyclodextrine (résultats non montrés). Cette drogue fait partie d'une famille d'oligosaccharide cyclique. Elle est capable de se lier aux molécules de cholestérol et de former un complexe extrêmement soluble.

De cette manière, le cholestérol est alors chassé des radeaux. De manière similaire au traitement CO, le marquage de la VE-cadhérine des cellules traitées ou non par cette drogue n'est pas modifié. Ceci suggère une fois de plus que l'immunofluorescence n'est pas la technique la plus adaptée pour voir l'association spécifique du pool de VE-cadhérine aux radeaux. Le marquage de la VE-cadhérine présente en dehors des radeaux semblerait masquer celui de la VE-cadhérine des radeaux. Il aurait été judicieux de prouver l'efficacité des traitements. Ainsi, nous aurions pu analyser la localisation du ganglioside GM1 ou la localisation de marqueurs protéiques associés aux radeaux comme la cavéoline-1 ou la flotilline. Également, l'analyse en western blot de la fraction de la VE-cadhérine associée aux radeaux des cellules endothéliales traitées au non avec un agent déstabilisant des radeaux aurait été la technique la plus adaptée. Cependant, par manque de temps, ces expériences n'ont pu être réalisées.

◆ Profil de phosphorylation.

Les radeaux lipidiques sont connus pour être des plateformes moléculaires favorisant la signalisation intracellulaire. La VE-cadhérine est une molécule d'adhérence impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires comme le contrôle de la perméabilité, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire. Le plus souvent, ces phénomènes sont corrélés à une augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine. La VE-cadhérine phosphorylée pourrait ainsi être préférentiellement associée à ces plateformes de signalisation. Le profil de phosphorylation de la VE-cadhérine associée (RL) ou non (NRL) aux radeaux lipidiques a été ainsi étudié dans des HUVECs (**Cf. Figure 35 B**). Le rapport obtenu soit pour la VE-cadhérine des radeaux, soit pour la VE-cadhérine non enchâssée aux radeaux est sensiblement le même. Ainsi, la VE-cadhérine des radeaux lipidiques des cellules endothéliales quiescentes est autant phosphorylée que celle non associée aux radeaux. Dans ce cas précis, la VE-cadhérine des radeaux ne serait pas impliquée dans des voies de signalisation faisant intervenir les phosphorylations sur tyrosine. Cependant, il est à noter que les cellules n'ont pas été traitées avec un agent induisant des phosphorylations sur tyrosine comme le VEGF. Seul l'état de phosphorylation des protéines a été bloqué par l'ajout de l'inhibiteur de phosphatase : l'ortho vanadate dans le tampon de lyse des cellules. L'augmentation des phosphorylations sur tyrosine de la VE-cadhérine par des agents stimulants constituerait une méthode plus appropriée permettant de mettre en évidence l'association différentielle de la VE-cadhérine phosphorylée aux radeaux lipidiques.

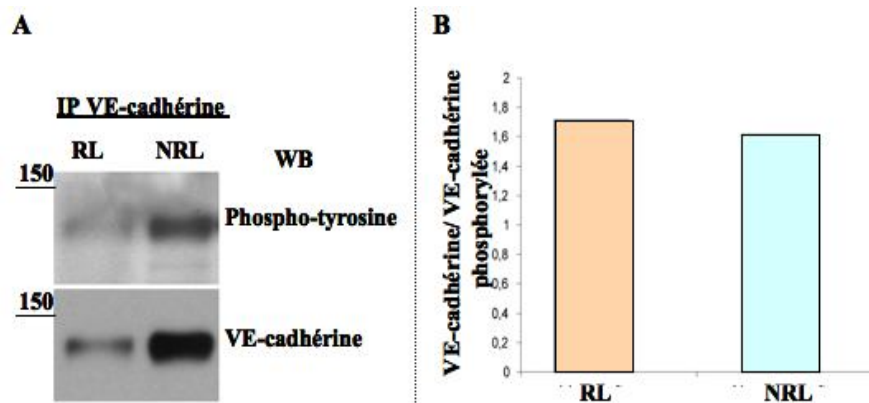


Figure 35 : La VE-cadhérine des radeaux lipidiques (RL) ne présente pas de profil de phosphorylation particulier.

Les cellules HUVECs sont lysées dans un tampon de lyse contenant de l'orthovanadate (100 mM). Le lysat d'HUVEC est ensuite fractionné sur gradient de sucrose. La VE-cadhérine est immunoprécipitée dans les deux types de fractions puis le profil de phosphorylation est analysé par western-blot (A). Les bandes des blots sont alors quantifiées par ImageJ , puis le rapport de la quantification obtenu pour la VE-cadhérine et celui obtenu pour la VE-cadhérine phosphorylée est calculé au sein des fractions LR et NLR (B).

5. Discussion et perspectives

La VE-cadhérine et la N-cadhérine sont deux molécules d'adhérences co-exprimées dans la cellule endothéliale. La première est spécifique de l'endothélium et présente une localisation jonctionnelle. Elle est depuis longtemps connue pour jouer un rôle clé dans l'angiogenèse. La N-cadhérine quant à elle, est exprimée par plusieurs types cellulaires au sein desquels elle est localisée au niveau de la jonction adhérente, à l'exception près des cellules endothéliales. En effet, sa localisation est observée de manière diffuse autour de la membrane. Au sein de l'endothélium, son rôle au cours de la maturation du vaisseau sanguin a été bien caractérisé alors que son rôle dans l'angiogenèse précoce reste controversé.

N-cadhérine endothéliale diffuse

Notre objectif a été de déterminer les mécanismes d'exclusion de la N-cadhérine des jonctions, qui pourraient avoir des conséquences sur la fonction de la N-cadhérine dans l'endothélium. Ainsi, l'étude des partenaires de la VE- et de la N-cadhérine a été réalisée, ce qui a permis de mettre en évidence des associations différentes pour deux molécules cytoplasmiques : la phosphatase SHP2 et la caténine p120. Ces deux molécules sont justement impliquées dans le maintien des molécules de cadhérine aux jonctions adhérentes. En effet, d'une part, des études ont montré que SHP2 liée aux cadhérines pouvait contrôler la phosphorylation des caténines associées aux cadhérines. Les caténines phosphorylées provoquent une dissociation de l' α -caténine ce qui déstabiliserait les cadhérines à la jonction (Tsukatani et al., 1997) (Ozawa and Kemler, 1998). SHP2 limiterait ces phosphorylations ce qui stabiliserait alors les cadhérines aux contacts intercellulaires. En effet, l'association de SHP2 à la N-cadhérine des cellules de lentille oculaire en différenciation est associée à une baisse de la phosphorylation des caténines et s'accompagne d'une stabilisation de la N-cadhérine aux jonctions intercellulaires (Leonard et al., 2008). Également, suite à un traitement à la thrombine, la VE-cadhérine ne s'associe plus à SHP2 alors que la β -caténine associée à la cadhérine devient de plus en plus phosphorylée (Ukropec et al., 2000). Tous ces phénomènes corréleraient avec une dissociation des jonctions (Rabiet et al., 1996). D'autre part, des études ont montré que p120 participait activement au maintien des clusters de E-cadhérine à la membrane ce qui renforcerait l'adhésion entre les cellules (Thoreson et al., 2000; Yap et al., 1998). Enfin, la caténine p120 est connue pour stabiliser les cadhérines à la membrane en les protégeant des voies d'endocytose (Kowalczyk and Reynolds, 2004; Peifer and Yap, 2003; Xiao et al., 2003; Xiao et al., 2005). Ainsi, la N-cadhérine serait plus susceptible d'être dégradée et aurait donc un turn-over membranaire plus rapide.

N-cadhérine endothéliale jonctionnelle

De plus, nous avons mis en évidence, et ceci pour la première fois au sein de plusieurs modèles cellulaires endothéliaux, que la localisation de la N-cadhérine était dépendante de la VE-cadhérine. Ces observations avaient été déjà suggérées dans une étude précédente (Deleuze et al., 2007). En absence de VE-cadhérine, la N-cadhérine devient alors jonctionnelle. La relocalisation de la N-cadhérine serait strictement dépendante du domaine juxtamembranaire de la VE-cadhérine. D'autres travaux ont montré que dans des CHO la VE-cadhérine mutée au niveau de la région proximale du domaine cytoplasmique ne délocalisait pas la N-cadhérine alors jonctionnelle (Navarro et al., 1998). Nous avons pu également mettre en évidence un tel résultat. En effet, dans notre modèle de cellules endothéliales déficientes en VE-cadhérine (cellules Endo -/-), seule la VE-cadhérine mutée dans la région proximale est capable de colocaliser avec la N-cadhérine au niveau des jonctions. Cela signifie qu'en absence du domaine de liaison à p120 fonctionnel, la VE-cadhérine ne peut pas exclure la N-cadhérine des jonctions.

En outre, la localisation différentielle a été observée dans les EBs déficient en VE-cadhérine. D'une part, en concordance avec des études ultérieures (Vittet et al., 1997), les EBs déficients en VE-cadhérine ne forment pas de bourgeons endothéliaux. D'autre part, nous avons mis en évidence dans ce modèle que la N-cadhérine bien que jonctionnelle ne participait pas à la formation des bourgeons endothéliaux, et ne remplaçait pas la fonction angiogénique de la VE-cadhérine. Ces observations mettent ainsi en évidence que même si la N-cadhérine possède une localisation jonctionnelle, cette localisation ne lui confère pas un rôle actif dans la formation des bourgeons endothéliaux. Ces observations montrent que la N-cadhérine pourrait ainsi être impliquée dans des voies signalétiques spécifiques et différentes de celles de la VE-cadhérine. Ces voies de signalisation pourraient probablement faire intervenir des partenaires cytoplasmiques différents.

Afin de répondre à cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier et de comparer les partenaires cytoplasmiques de la N-cadhérine jonctionnelle ou diffuse. Tout d'abord, comme SHP2 est une molécule responsable de la localisation jonctionnelle des cadhérines, nous pourrions dans des expériences d'immunoprécipitation, analyser et comparer l'association de cette protéine à la N-cadhérine diffuse ou jonctionnelle. Afin d'étendre cette analyse et de mettre en évidence l'association différentielle d'autres partenaires cytoplasmiques de chacune des cadhérines, l'analyse protéomique des interactants cytoplasmiques pourrait être réalisée. Il serait notamment intéressant de se pencher sur l'analyse de protéines kinases comme Src (Lambeng et al., 2005) (Wallez et al., 2007) ou de phosphatases comme la phosphatase VE-PTP (Baumer et al., 2006), connues pour être impliquées dans l'angiogenèse. Cette analyse pourrait porter également sur les différentes VE-cadhérines murines. Nous pourrions mettre en parallèle les phénotypes

angiogéniques de chaque VE-cadhérine mutantes et les partenaires associés à chaque VE-cadhérine mutantes.

Jonctionnalité de la N- et de la VE-cadhérine et association aux radeaux lipidiques.

La N-cadhérine jonctionnelle des cellules myoblastiques est capable de s'associer préférentiellement aux radeaux lipidiques, ce qui permet d'ancrer de manière stable la cadhérine aux jonctions adhérentes (Causeret et al., 2005; Taulet et al., 2009). L'association différentielle des deux cadhérines endothéliales aux radeaux lipidiques pourrait ainsi représenter un moyen de stabiliser ces cadhérines à la jonction interendothéliale. Tout d'abord, nous avons mis en évidence que, contrairement à la localisation jonctionnelle des radeaux lipidiques des cellules épithéliales (MDCK), les radeaux lipidiques des cellules endothéliales ne semblent pas être autant concentrés aux jonctions intercellulaire. En effet, la localisation jonctionnelle du ganglioside GM1, de la cavéoline-1 a été difficilement mise en évidence. Également, bien qu'une très faible proportion de VE-cadhérine soit associée aux radeaux, il semblerait que la localisation jonctionnelle de la VE-cadhérine ou de la N-cadhérine (en absence de VE-cadhérine) ne soit pas dépendante d'une association aux radeaux lipidiques. Ainsi, à la différence des cellules épithéliales, la notion de jonctionnalité d'une cadhérine et le terme de radeau dans des cellules endothéliales sont deux choses bien distinctes.

La VE-cadhérine des radeaux

Par la suite, la VE-cadhérine des radeaux a été analysée de manière à montrer que cette cadhérine présentait des spécificités en comparaison de la VE-cadhérine présente en dehors des radeaux. L'association des partenaires cytoplasmiques comme les caténines a été alors étudiée. La VE-cadhérine des radeaux semble lier les partenaires cytoplasmiques comme l' α -, la β - et la γ -caténine de la même manière que la VE-cadhérine non associée aux radeaux lipidiques. Toutefois, p120 semble s'associer principalement à la VE-cadhérine des radeaux. Ainsi, comme la caténine p120 des cellules myoblastiques (Taulet et al., 2009), la caténine p120 des cellules endothéliales stabiliserait la VE-cadhérine aux radeaux. La VE-cadhérine associée aux radeaux constituerait alors une plateforme protéo-lipidique principalement impliquée dans la stabilité de la jonction interendothéliale.

Les radeaux de cholestérol et la forme phosphorylée de la VE-cadhérine sont tous deux impliqués dans des voies de signalisation. Ainsi, la phosphorylation de la VE-cadhérine des radeaux a été étudiée de manière à montrer qu'elle était impliquée dans des voies de signalisation. Nous avons montré dans des cellules HUVECs quiescentes et non stimulées, que la VE-cadhérine des radeaux, et celle présente en dehors des radeaux, présentait des profils de

phosphorylation très faibles et semblables. Dans des cellules quiescentes, la VE-cadhérine des radeaux lipidiques ne semble donc pas participer activement à des voies de signalisation. Il serait alors intéressant d'étudier le profil de phosphorylation de la VE-cadhérine associée aux radeaux dans des cellules « actives » c'est à dire dans des cellules éparses, ou dans des cellules stimulées par des agents pro-angiogénique. Ce profil pourrait être comparé à celui de la VE-cadhérine non associée aux radeaux.

En fonction du profil de phosphorylation obtenu, ces résultats nous renseigneraient alors sur le rôle de la VE-cadhérine des radeaux. Ceci pourrait nous indiquer son implication dans la transduction du signal, ou dans la stabilisation de la jonction. Il est à noter néanmoins que suite à des drogues visant à déstructurer les radeaux, la localisation VE-cadhérine des radeaux n'a pas été modifiée. Le marquage prédominant de la VE-cadhérine, présente en dehors des radeaux, semblerait masquer celui de la VE-cadhérine des radeaux.

B. Étude du rôle différentiel de la N- de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse

1. Contexte scientifique

La N-cadhérine présente une localisation subcellulaire originale qui est précisément contrôlée par la VE-cadhérine. Cette localisation pourrait lui prévaloir une fonction spécifique dans la biologie de l'endothélium, notamment au cours de l'angiogenèse. Notre objectif a été de mieux caractériser les mécanismes moléculaires conférant à la VE-cadhérine une fonction spécifique dans l'angiogenèse. Ainsi, notre travail a eu pour but de décrypter la contribution différentielle des deux cadhérines en analysant les domaines protéiques de chacune des VE- et N-cadhérines potentiellement impliquées dans l'angiogenèse. Il nous a semblé judicieux de focaliser notre étude sur deux régions de la VE-cadhérine potentiellement importante pour la spécificité fonctionnelle de cette protéine :

-Le domaine de liaison de la β -caténine de la VE-cadhérine.

Carmeliet et al. ont montré que ce domaine était fondamental pour le développement vasculaire du fait du phénotype léthal des souris exprimant une VE-cadhérine délétée de cette région de la molécule (Carmeliet et al., 1999). Cependant, nous pouvons nous demander si cette région possède des informations fonctionnelles spécifiques, indépendantes de la liaison propre des caténines. La N-cadhérine possède une région homologue au niveau du domaine cytoplasmique, également capable de lier les caténines. Ce domaine pourrait-il remplacer celui de la VE-cadhérine du point de vue fonctionnel? Ou bien la région de liaison aux caténines (CBD) de la VE-cadhérine fournirait-elle d'autres informations? Ou lier d'autres partenaires spécifiques de signalisation?

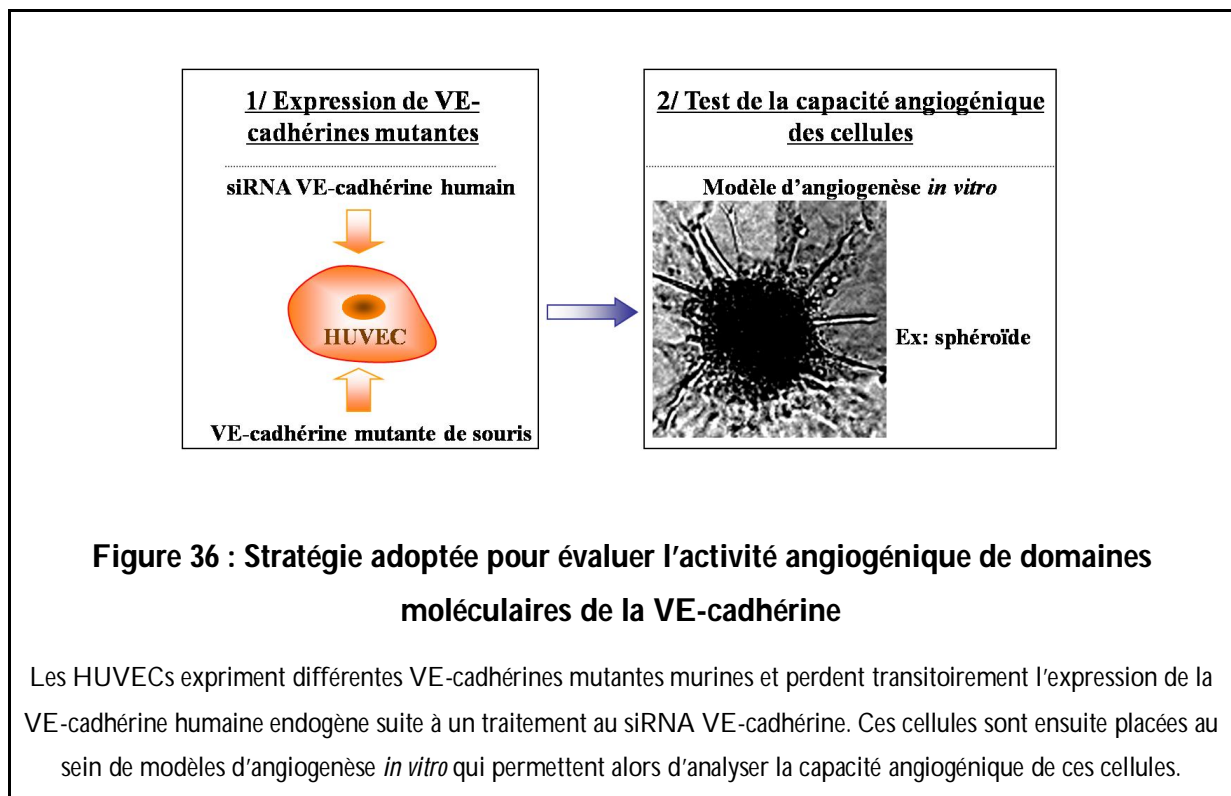
-Le domaine extracellulaire.

De nombreuses études ont montré l'importance du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine dans le rôle adhésif de cette molécule d'adhérence. Le rôle du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine se limite-t-il uniquement à un rôle de « glue » intercellulaire ? Quelle est le rôle exact de ce domaine ? Favorise-t-il la transmission d'un signal provenant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule ? Notre laboratoire a montré que le remplacement du domaine extracellulaire du domaine de la VE-cadhérine par celui de la N-cadhérine permet à cette protéine chimérique d'être exprimée aux jonctions dans des cellules CHO (projet de Master 2 de Stella

Oun). Cette protéine peut-elle être fonctionnelle et permettre l'angiogenèse lorsqu'elle est exprimée dans des cellules endothéliales?

2. Stratégie expérimentale

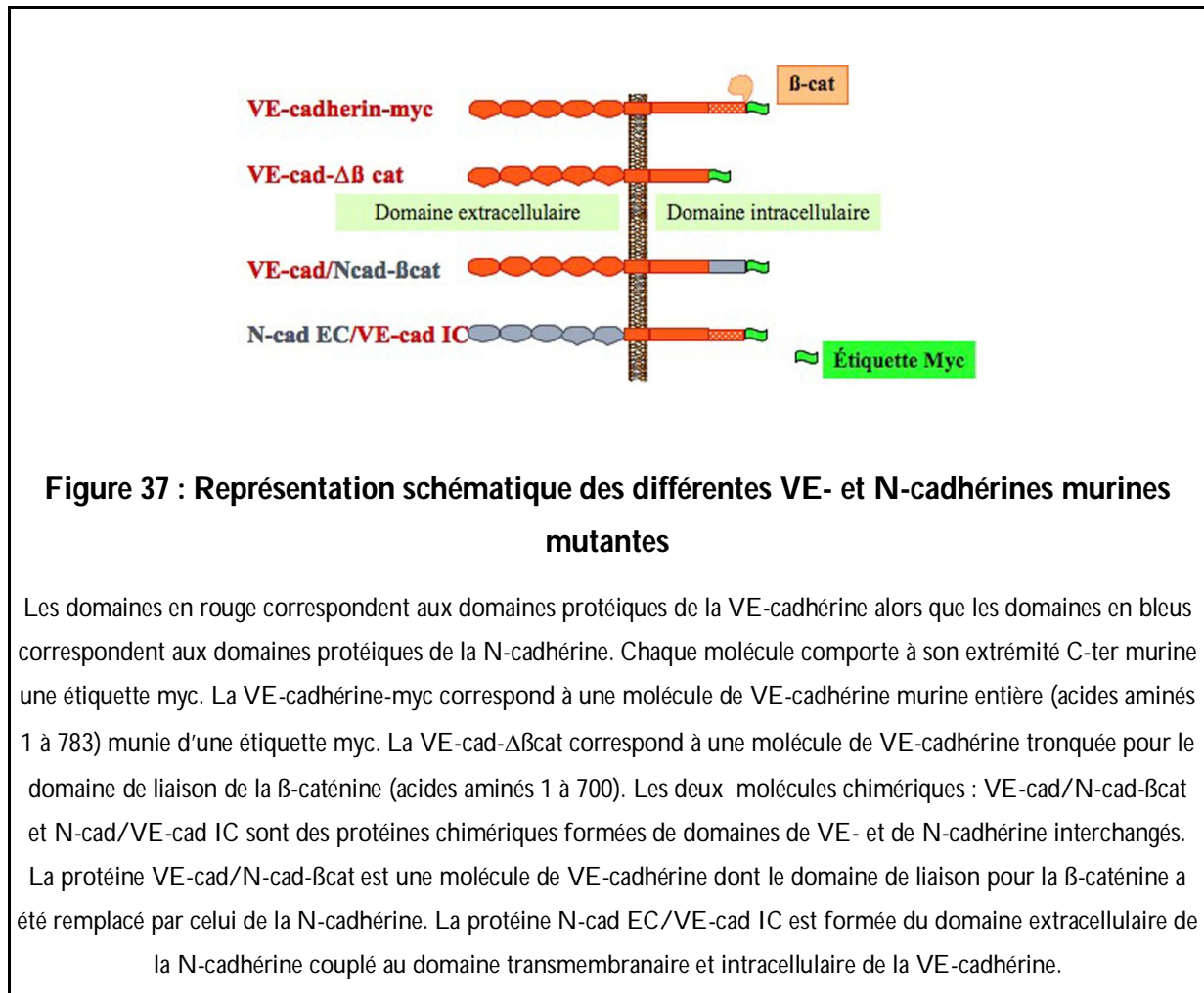
La stratégie adoptée consistera à l'analyse du phénotype angiogénique de cellules endothéliales exprimant des molécules de VE-cadhérine mutées pouvant comporter des domaines protéiques de la N-cadhérine au sein de modèles d'angiogenèse *in vitro* (Cf. **Figure 36**).



Les cellules HUVECs constituent le modèle cellulaire endothélial dans lequel les différentes VE-cadhérine mutantes ont été exprimées. Afin de montrer la fonction angiogénique spécifique des différentes VE-cadhérine mutantes, l'expression de la VE-cadhérine endogène doit être temporairement inhibée. Ainsi, ces cellules seront transfectées à la fois par le siRNA dirigé contre la VE-cadhérine et par une construction de VE-cadhérine murine mutante.

a. Construction et description des différentes VE-cadhérine murines mutantes

Les différentes VE-cadhérine murines mutantes sont représentées sur le schéma ci-dessous (Cf. **Figure 37**).



La fabrication des mutants a été réalisée par Stella Oun au cours de son Master 2. Brièvement, les ADNc codant pour les VE-cadhérines, ou les N-cadhérines murines ont été amplifiés par PCR et clonés dans le plasmide d'expression eucaryote pCDNA 3.1. Chaque construction possède une étiquette myc permettant la reconnaissance spécifique de la protéine transfectée. VE-cadhérine-myc code pour la protéine VE-cadhérine murine entière. VE-cad-Δβcat code pour une protéine déletée de 83 acides aminés C-terminaux, contenant le domaine de liaison des caténines. La protéine chimérique VE-cad/N-cad-βcat code pour une protéine formée du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine couplé au domaine intracellulaire de la N-cadhérine. La deuxième molécule chimérique : N-cad EC/VE-cad IC code pour la protéine

composée du domaine extracellulaire de la N-cadhérine couplé au domaine intracellulaire de la N-cadhérine.

Ainsi, la protéine VE-cad- $\Delta\beta$ cat et VE-cad/N-cad- β cat permettent d'analyser la contribution du domaine CBD, alors que N-cad/VE-cad IC permet de définir la fonction spécifique éventuelle du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine.

b. Modèles d'angiogenèse *in vitro* utilisés

La capacité angiogénique des cellules HUVECs transfectées ou non est évaluée au sein de 3 tests d'angiogenèse *in vitro* décrits dans la littérature :

- le modèle matrigel permet le développement de structures précapillaires mimant l'organisation d'un réseau vasculaire (Maheshwari et al., 1991).
- le modèle sphéroïde permet de montrer la capacité qu'ont les cellules à former des structures bourgeonnantes (Korff and Augustin, 1998) (Korff and Augustin, 1999).
- le modèle de vacuolisation permet d'analyser la formation de la lumière endothéliale par vacuolisation des cellules en gel de collagène (Yang et al., 1999).

Avant de répondre à cette problématique, les trois tests d'angiogenèse *in vitro* ont été mis au point. En parallèle, au sein même de ces modèles, le phénotype angiogénique spécifique de la déficience en VE-cadhérine, obtenue par stratégie siRNA a été analysé. La seconde étape a été de valider la faisabilité d'une double transfection (plasmide d'expression concomitant avec le siRNA) dans des cellules HUVECs, sachant que ces cellules primaires ne sont pas considérées comme facilement transfectables. Enfin, l'analyse des phénotypes des HUVECs transfectés dans ces modèles nous permettrait d'évaluer l'influence des VE-cadhérines mutantes sur certains paramètres *in vitro* de l'angiogenèse.

3. Matériel et méthodes

a. Culture de cellules HUVECs et nucléofection par méthode

AMAXA

Des HUVECs commerciales (Lonza) ont été utilisées dans la plupart des expériences (passage P3). Elles sont cultivées dans du milieu EBM-2 (Lonza Cambrex) supplémenté par 2% de sérum de veau foetal et des facteurs de croissance contenus dans le kit « Single Quots » (VEGF, hFGF-B (human Fibroblast Growth Factor), hydrocortisone, vitamine C, R3-IGF-1 (R3-Insulin-like Growth Factor), héparine, hEGF (human Epithelial Growth Factor) et antibiotique GA : 1000 (gentamycine et amphotéricine B)). 24 heures avant la nucléofection, les

cellules sont trypsinées etensemencées à 32.000 cellules/cm². Le jour de la nucléofection, les cellules HUVECs sont trypsinées et 10⁶ cellules sont resuspendues dans 100 µl de mélange « Nucleofector » fourni dans le kit « Nucleofection HUVEC » (Amaxa). Les cellules sont transférées dans la cuve de l'électroporateur contenant 3 µg de siRNA contrôle ou de siRNA dirigé contre la VE-cadhérine (Thermo Scientific Dharmacon). A cette même suspension cellulaire, il peut être également ajouté 2 µg d'un des 4 plasmides pcDNA3.1 codant pour les VE-cadhérines murines mutantes, citées dans le paragraphe 2.a (page). Ces plasmides ont été amplifiés grâce au kit « Endotoxin Free » (Qiagen). Les cellules sont nucléofectées selon le programme A-034 d'Amaxa, reprises dans 500 µl de milieu EBM-2 complet etensemencées dans une boîte de culture cellulaire de 35 mm de diamètre. Les cellules sont placées dans une étuve de culture cellulaire (5% CO₂, humidité 100%) et utilisées 24 heures après la transfection.

b. Formation de structures précapillaires (modèle de matrigel)

Quelques heures avant la mise en culture des HUVECs sur matrigel, les puits d'une plaque 24 puits sont recouverts de 275 µl de matrigel (BD Bioscience). De manière à ce que le matrigel polymérise rapidement, la plaque est tout de suite placée dans une étuve de culture cellulaire (5% CO₂, humidité 100%). En parallèle, les cellules HUVECs, sont rincées, trypsinées et numérées sur lame de Malassez. Une suspension cellulaire à 100.000 cellules/ml dans de l'EBM-2 complet est réalisée et 1 ml de cette solution est placé dans chaque puits de la plaque 24 puits recouvert de matrigel. Au bout de 2 heures, les cellules sont observées sur un microscope inversé à contraste de phase et iconographiées après 2 à 9 heures d'incubation sur matrigel.

c. Formation de structures bourgeonnantes (modèle sphéroïde)

Nous nous sommes inspirés du protocole établi par Korff et al. (Korff and Augustin, 1998) (Korff and Augustin, 1999).

Formation des sphéroïdes

Les cellules HUVECs sont trypsinées, numérées sur lame de Malassez et centrifugées. Le culot est repris dans du milieu EBM-2 contenant 2,5% de méthylcellulose (à 2,5 mg/ml finale) de manière à obtenir une concentration cellulaire finale de 10.000 cellules/ml. 100 µl de cette suspension cellulaire sont ensuiteensemencés dans chaque puits d'une plaque 96 puits à fond rond non-traitée pour la culture cellulaire. Les cellules tombent au fond du puit pour former une structure sphérique compacte appelée sphéroïde.

Bourgeonnement en collagène

24 heures après, les sphéroïdes sont récoltés délicatement à l'aide d'un cône de pipette 1 ml coupée à son extrémité. Ces sphéroïdes sont centrifugés pendant 5 minutes à 500 tours par minute. Le culot de sphéroïdes est utilisé dans les 15 minutes pour éviter qu'ils ne se collent entre eux. En parallèle, une solution de collagène est préparée et maintenue dans la glace. Cette solution de collagène se compose de collagène de rat de type I (2,4 mg/ml) dilué dans de l'EBM-2 non supplémenté. Du PBS 10X est additionné afin de maintenir les concentrations salines du mélange. Le collagène est ensuite neutralisé extemporanément par du NaOH 1N (2,3 % du volume de collagène ajouté).

Le culot de sphéroïdes est resuspendu dans du milieu EBM-2 contenant 0,5 % de méthylcellulose additionné de SVF (4 %) et doublement supplémenté en facteurs de croissance (VEGF, hFGF-B, hydrocortisone, vitamine C, R3-IGF-1, héparine, hEGF, antibiotique GA : 1000) fournis dans le kit « Single Quots » de Lonza. Cette solution est nommée : EBM-2/MC. Le volume de milieu d'EBM-2/MC est calculé de manière à obtenir environ 90 sphéroïdes/ml. Les sphéroïdes en suspension sont mélangés volume/volume avec la solution de collagène neutralisée. 1 ml de ce mélange est réparti immédiatement dans chaque puits d'une plaque 24 puits préchauffée à 37°C. Cette plaque est ensuite placée à l'étuve 37°C pendant 30 minutes, ce qui permet au gel de collagène de polymériser. Les gels de collagène sont ensuite recouverts de 100 µl de milieu EBM-2 supplémenté par du VEGF (50 ng/ml) et du FGF (30 ng/ml). Les sphéroïdes sont laissés 24 heures dans l'étuve, puis sont régulièrement observés avec un microscope inversé en contraste de phase et photographiés.

d. Formation de la lumière endothéliale par fusion de vacuoles (modèle de vacuolisation)

Le protocole que nous avons utilisé a été inspiré de celui de Koh. et al (Koh et al., 2008).

24 heures après la nucléofection, les cellules transfectées sont trypsinées et numérées sur lame de Malassez. Puis, une suspension cellulaire de 10^7 cellules/ml est préparée dans du milieu M199 (Invitrogen) contenant 20% SVF (Cambrex, Lonza), 2% de supplément de croissance spécifique (LSGS, Cascad Biologics), 1% d'antibiotique/antifongique (ATAM)). Ces cellules sont ensuite placées dans de la glace.

En parallèle, une solution de collagène de rat de type I à 4,68 mg/ml est préparée dans du milieu M199 (1X final) supplémenté par 40 ng/ml de VEGF, 40 ng/ml de FGF, 50 ng/ml d'acide ascorbique et 50 ng/ml de Phorbol Myristate Acetate (PMA) ainsi que par un supplément de sérum réduit II (RSII) préparé suivant la référence suivante : (Koh et al., 2008) (0,5 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma), 5 µg/ml d'insuline recombinante humaine (Sigma), 5

ng/ml de Na₂SeO₃, 5 µg/ml d'holo-Transferrine humaine (Sigma) et 4,82 µg/ml d'acide oléique (Sigma)). Le collagène est ensuite neutralisé extemporanément par du NaOH 1N (2,3 % du volume de collagène ajouté). 200 µl de la suspension cellulaire est mélangé à 800 µl de solution de collagène neutralisée afin d'obtenir au final une suspension cellulaire à 2.10⁶ cellules/ml dans du collagène à 3,75 mg/ml. Avec précaution, 30 µl de gel sont coulés dans un puit d'une plaque 96 puits préchauffée à 37°C. La plaque est alors placée 30 minutes dans l'incubateur à 37°C afin que les gels de collagène polymérisent. 100 µl de milieu de culture M199 1X supplémenté par du RSII et par des facteurs de croissance (40 ng/ml de VEGF, 40 ng/ml de FGF, 50 ng/ml d'acide ascorbique et 50 ng/ml de PMA (Phorbol Myristate Acetate)) est ajouté dans chaque puits. Ces gels sont maintenus dans l'incubateur pendant 48 heures. Afin d'observer les vacuoles formées, les gels de collagènes sont colorés au bleu de toluidine. Pour cela, les gels sont fixés dans une solution de glutaraldehyde 3% pendant 2 heures, colorés par 3% de bleu de toluidine diluée dans 30% d'éthanol et rincés à l'eau de nombreuses fois. Les gels sont ensuite montés sur lame de verre puis observés au microscope droit en contraste de phase.

Les gels sont également fixés pour des marquages immunofluorescents. Pour cela, les gels sont fixés par 3% de PFA pendant 30 minutes, suivis d'une perméabilisation par 0,2 % de Triton X-100 pendant 20 minutes. Les gels sont ensuite incubés avec une solution de BSA 1% pendant 1 heure. Ces gels sont ensuite incubés avec des anticorps primaires spécifiques suivis d'anticorps secondaires fluorescents. Les marquages en épifluorescence sont enfin observés sur un microscope à épi-fluorescence.

4. Résultats

a. Modèles d'angiogenèse

◇ Influence de l'invalidation de la VE-cadhérine sur l'organisation d'un réseau précapillaire : modèle en matrigel.

Le matrigel est un mélange de protéines sécrétées par les cellules d'un sarcome murin. La composition protéique est complexe, cependant la laminine et le collagène de type IV, deux composants de la lame basale, semblent être les deux principales molécules qui composent le matrigel. En présence de cette matrice, les cellules endothéliales s'organisent et forment des réseaux en « toile d'araignée ». Ces réseaux sont évocateurs de structures pré-capillaires.

Dans un premier temps, les conditions optimales de la culture cellulaire en matrigel ont été mises au point. Ainsi, de nombreuses conditions ont été testées: milieux de culture, nombre de cellules, temps d'observation (non montré). Après 8 heures de culture sur une matrice de matrigel, les HUVECs ont la capacité de former de nombreuses structures précapillaires ramifiées entre elles (**Cf. Figure 38**). Les cellules transfectées par le siRNA contrôle s'organisent en de nombreuses structures précapillaires. La technique de transfection par nucléofection ainsi que l'utilisation de siRNA contrôle ne modifie pas la formation de telles structures. Néanmoins, les cellules traitées par le siRNA VE-cadhérine perdent la capacité de s'organiser en réseau. Seuls quelques groupes de cellules isolées forment de courtes associations.

En parallèle, l'extinction de l'expression de la VE-cadhérine par ce siRNA a été évaluée en culture classique par technique d'immunofluorescence (**Cf. Figure 38 B**). Il apparaît très clairement que la quasi-totalité des cellules ne présente plus de marquage VE-cadhérine démontrant que le traitement par le siRNA a été efficace. Ces résultats montrent que les HUVECs ont la capacité de former des structures pré-capillaires et que l'absence de VE-cadhérine induit un phénotype visible et particulier. Cette cadhérine semble fondamentale au cours de l'organisation des cellules endothéliales dans des étapes précoces de l'angiogenèse.

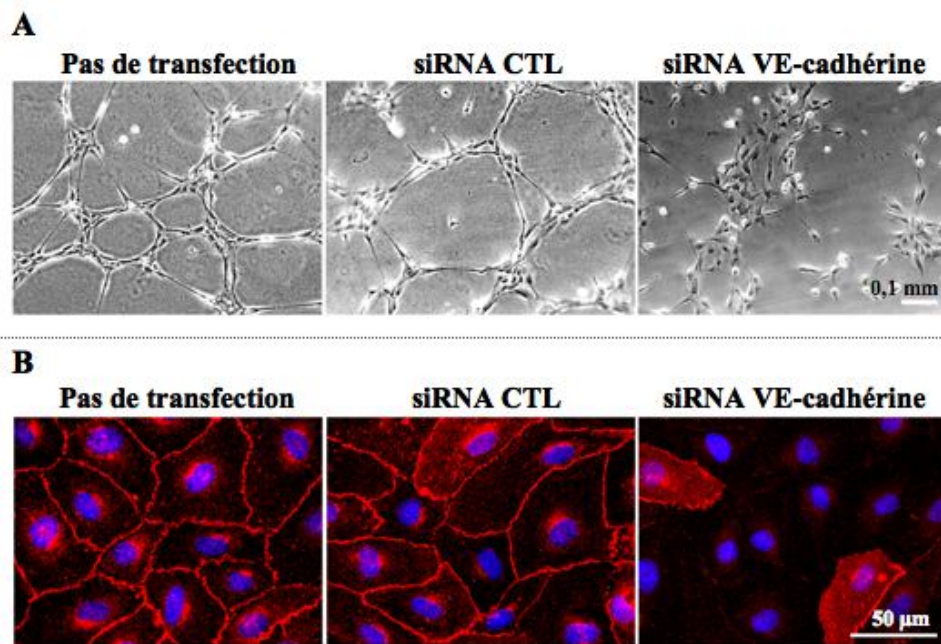


Figure 38 : Au sein du modèle matrigel, l'absence de VE-cadhérine désorganise les structures précapillaires

Les cellules HUVECs ont été nucléofectées soit par un siRNA contrôle (CTL), soit par un siRNA dirigé contre la VE-cadhérine ou n'ont pas été nucléofectées. 24 heures après la nucléofection les cellules ont été trypsinées puis 50.000 cellules ont étéensemencées dans des puits de plaques 24 puits contenant du matrigel. Les cellules ont été observées régulièrement sous microscope inversé jusqu'à 8 heures (A). Afin de montrer l'efficacité d'extinction du siRNA, les cellules n'ayant pas servi au test matrigel ont été mises en culture sur lamelles de verre, puis fixées et perméabilisées. Elles ont été par la suite co-marquées par des anticorps anti-VE-cadhérine et leurs noyaux ont colorés au bleu de Hoechst (B).

♦ Conséquences de l'invalidation de la VE-cadhérine sur la formation de la lumière endothéliale : modèle de vacuolisation

La vacuolisation est une étape relativement tardive dans l'angiogenèse. En effet, la formation de vacuoles permettrait la formation du tube et de la lumière endothéliale. Les multiples vacuoles formées dans le cytoplasme de la cellule endothéliale fusionneraient entre elles et formeraient un « trou » au milieu de la cellule. Ce trou constituerait une ébauche de lumière du tube endothélial. Le modèle de vacuolisation apparaît donc comme un modèle d'angiogenèse *in vitro* tout à fait pertinent pour analyser l'influence de molécules spécifiques dans certaines étapes de l'angiogenèse.

Le modèle de vacuolisation consiste en la mise en culture de cellules dans une matrice de collagène de type I. Au sein de cette matrice, les cellules HUVECs sont capables de former des tubes endothéliaux.

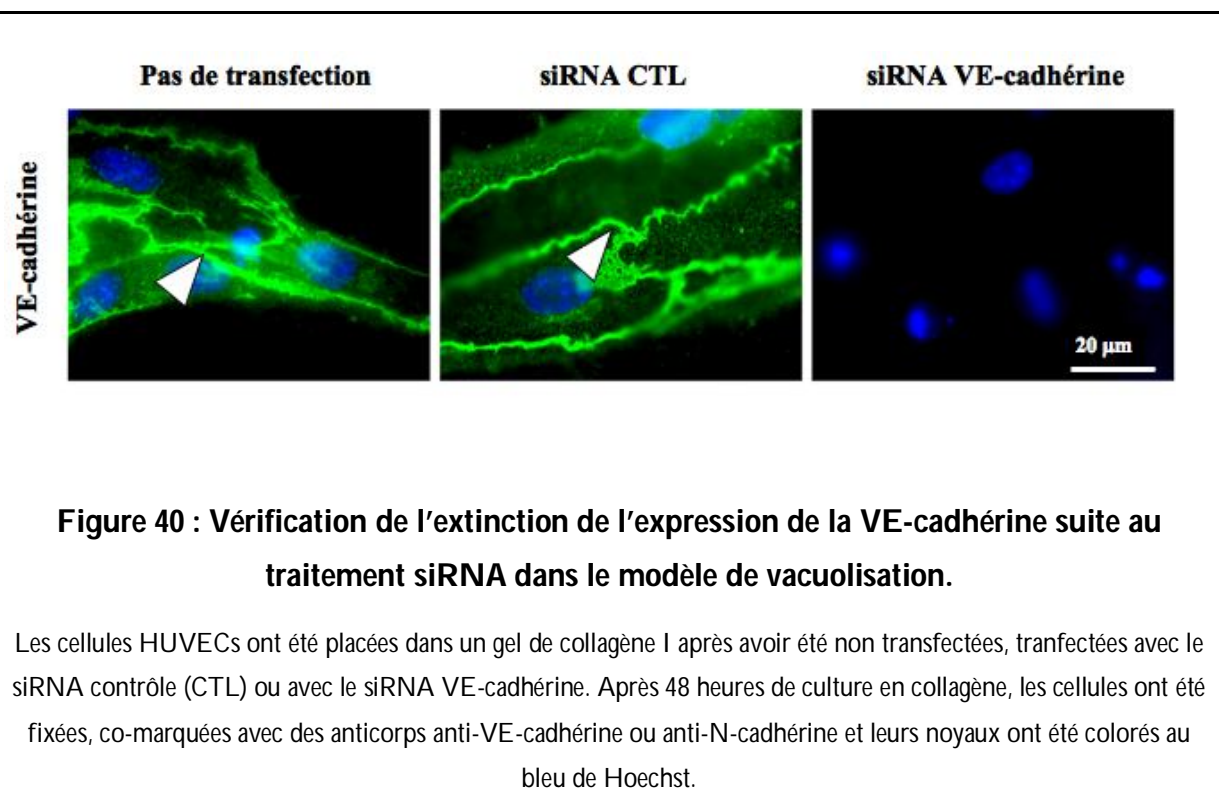
Les HUVECs non transfectées se regroupent, forment de grosses vacuoles et s'organisent en tubes endothéliaux avec une lumière au centre du tube (**Cf. Figure 39**). Les cellules traitées avec le siRNA contrôle se comportent de la même manière que les cellules non nucléofectées. Elles sont capables de former une lumière endothéliale (voir flèche blanche **Figure 39**). Les cellules déficientes en VE-cadhérine quant à elles, ne forment pas de tubes. Elles présentent de très petites vacuoles au niveau de leur cytoplasme, qui ne semblent pas fusionner. Ces résultats montrent donc que les HUVECs sont des cellules endothéliales tout à fait adaptées à ce genre de test in vitro. De plus, la VE-cadhérine joue un rôle crucial dans l'organisation du tube endothélial.



Figure 39 : Effet de la déficience en VE-cadhérine sur la formation des vacuoles et sur la formation de la lumière endothéliale

Les cellules HUVECs ont été placées dans un gel de collagène I après avoir transfectées ou non avec le siRNA contrôle (CTL) ou avec le siRNA VE-cadhérine. Après 48 heures en culture de collagène, les cellules ont été fixées puis colorées au bleu de Toluidine. Les flèches indiquent les lumières des tubes endothéliaux ou les vacuoles intracellulaires.

En parallèle, afin de s'assurer du phénotype particulier observé dans des cellules traitées au siRNA VE-cadhérine, l'expression de la VE-cadhérine a été analysée en immunofluorescence. Ainsi, contrairement aux cellules non nucléofectées ou nucléofectées avec le siRNA contrôle (voir flèches blanches Figure 40), le marquage VE-cadhérine des cellules traitées au siRNA VE-cadhérine est inexistant. Le phénotype « non fusionné » observé dans le cas de la coloration au bleu de toluidine est donc dû à la déficience en VE-cadhérine.



En outre, la localisation subcellulaire des molécules d’adhérence comme la VE-, la N-cadherine et la protéine PECAM a été analysée dans ce modèle en immunofluorescence. Le marquage de la VE-cadherine et de PECAM s’observe aux contacts intercellulaires (voir flèches blanches Figure 41 A). La N-cadherine est localisée de manière diffuse à la surface membranaire (Cf. **Figure 41 B**). Les résultats d’immunofluorescence montrent ainsi qu’au sein de ce modèle, ces protéines occupent la localisation subcellulaire attendue.

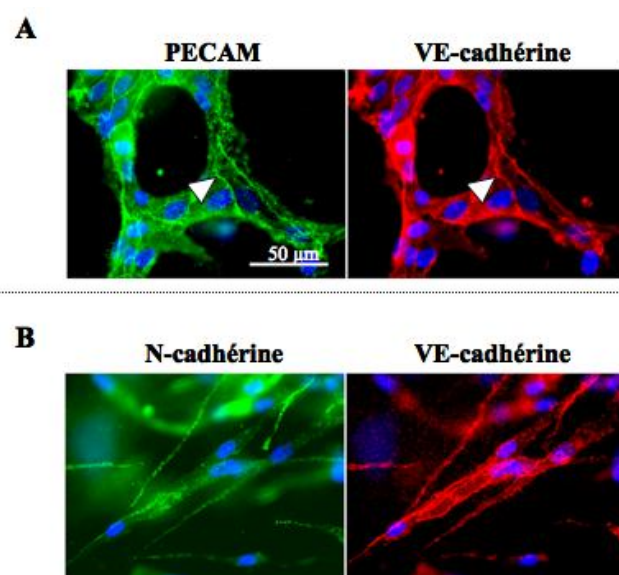


Figure 41 : Localisation subcellulaire de marqueurs endothéliaux au sein du modèle de vacuolisation

Les cellules HUVECs ont été placées dans un gel de collagène I. Après 48 heures de culture en collagène, les cellules ont été fixées, perméabilisées puis soit co-marquées avec des anticorps anti-VE-cadhérine ou anti-PECAM (A) soit co-marquées avec des anticorps anti-VE- et -N-cadhérine (B). Leurs noyaux ont été colorés au bleu de Hoechst.

Les HUVECs sont des cellules endothéliales tout à fait adaptées pour le test de vacuolisation. Elles forment spontanément des tubes endothéliaux qui possèdent une lumière en son centre. De plus, la localisation des molécules d'adhérences dans ce modèle est la même que celle attendue. Également, la déficience en VE-cadhérine a un effet drastique sur l'organisation de telles structures. La VE-cadhérine joue donc un rôle clé dans la formation des tubes endothéliaux.

◆ Modèle sphéroïde

Le modèle sphéroïde présente de nombreuses similitudes avec le modèle des EBs issus des cellules embryonnaires de souris, à la différence que les cellules utilisées, sont des cellules endothéliales différenciées comme les cellules HUVECs. Ce modèle consiste en la formation d'un sphéroïde de cellules HUVECs dans un milieu semi-liquide. Ce sphéroïde est placé dans une matrice de collagène I ce qui permet la formation de structures bourgeonnantes mimant l'angiogenèse.

Les HUVECs placées dans une matrice inerte semi-liquide, s'aggrègent pour former une structure compacte et sphérique contenant 1000 cellules (ou 3000 cellules dans certaines expériences) (Cf. **Figure 42 A**).

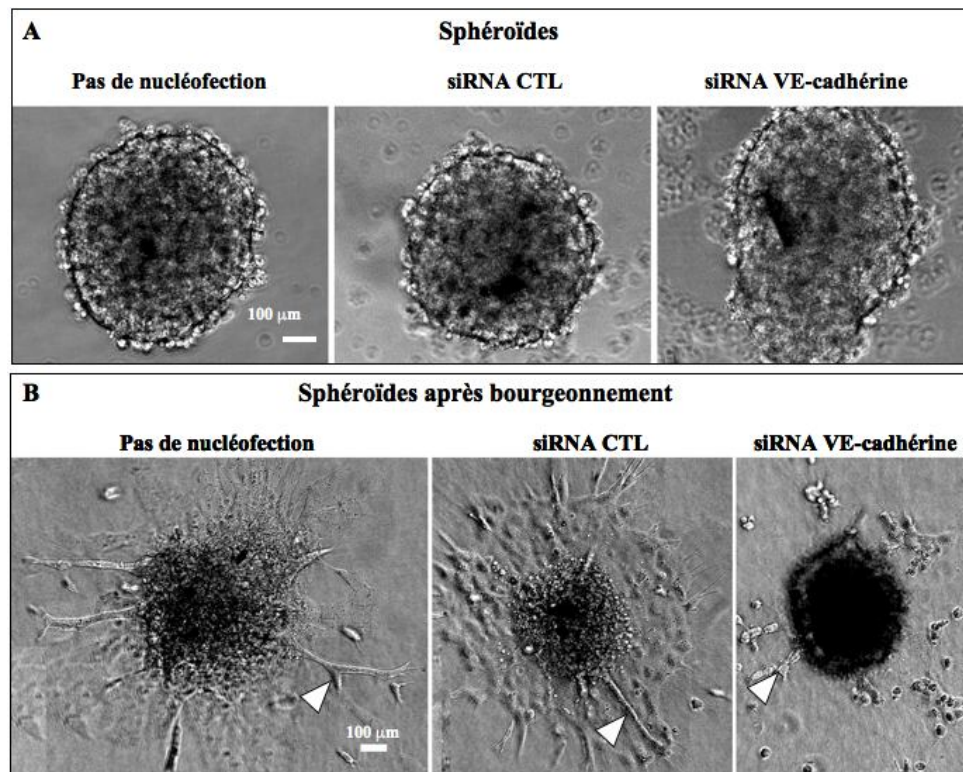


Figure 42 : Aspect des sphéroïdes d'HUVECs et des bourgeons endothéliaux formés suite à un traitement avec un siRNA VE-cadhérine

Les HUVECs sont laissées 24 heures dans une matrice de méthylcellulose permettant la formation des sphéroïdes et observées sous un microscope inversé (A).

Ces sphéroïdes sont ensuite placés dans une matrice de collagène de type I. 48 heures après, des clichés des sphéroïdes en bourgeonnement sont pris sous un microscope inversé (B).

Placées en matrice de collagène, les cellules des sphéroïdes peuvent migrer et former des bourgeons endothéliaux (Cf. **Figure 42 B**). Les cellules HUVECs sauvages ou traitées au siRNA contrôle forment des bourgeons endothéliaux longs et ramifiés (voir les flèches blanches). Même si les bourgeons endothéliaux, des HUVECs traitées au siRNA contrôles, sont moins nombreux, ils ont la même morphologie que les bourgeons endothéliaux sauvages. Les bourgeons des cellules déficientes en VE-cadhérines sont inexistants. Seules quelques cellules se regroupent et forment des ébauches de bourgeons. La VE-cadhérine est indispensable à la formation de telles structures au sein de ce modèle.

Ainsi, dans ce modèle, les HUVECs sont aptes à former des structures angiogéniques. De plus la VE-cadhérine semble participer activement à la formation de telles structures. Aux vues des résultats, il est clair que ce modèle est adapté pour l'analyse des phénotypes angiogéniques des cellules exprimant une des 4 VE-cadhérine murines mutantes.

En parallèle à la mise en place des trois tests d'angiogenèse *in vitro*, nous avons testé l'efficacité de « rescue » de l'expression de la VE-cadhérine suite à l'extinction mis en place, la faisabilité d'une double transfection a été testée. Ainsi, les cellules ont été doublement transfectées par le siRNA VE-cadhérine et par un des plasmides contenant le cDNA d'une VE-cadhérine murine mutante. De plus, l'efficacité de cette double transfection a été étudiée. En effet, il apparaît primordial que les HUVECs aient des taux de transfection et d'expression des protéines mutantes élevés. Ceci permettrait une analyse plus confortable des phénotypes angiogéniques propres aux différentes VE-cadhérines mutantes exprimées.

b. Analyse de la double transfection : siRNA VE-cadhérine et VE-cadhérines mutantes

Les HUVECs transfectées avec les différents cDNA codant les différentes VE-cadhérine mutantes sont capables d'exprimer ces protéines. Ces protéines sont exportées à la membrane et présentent une localisation membranaire et jonctionnelle (non montré). Par ailleurs, nous avons montré que le siRNA dirigé contre la VE-cadhérine endogène des HUVECs est capable d'inhiber l'expression de cette cadhérine (**Cf. Figure 43**). Ainsi, l'inhibition de la VE-cadhérine endogène et l'expression des différentes VE-cadhérines mutantes ont été testés (**Cf. Figure 43 B**). Les résultats montrent que suite à ces doubles nucléofections, les HUVECs expriment les 4 VE-cadhérines mutantes tout en n'exprimant plus de VE-cadhérine endogène suite au traitement au siRNA VE-cadhérine. En effet, en absence de VE-cadhérine, toutes les protéines mutantes sont synthétisées et exportées correctement à la membrane.

De plus, elles sont localisées au niveau des contacts interendothéliaux (voir les flèches blanches). Cependant, la vue d'ensemble du tapis cellulaire à plus faible grossissement montre que le taux d'expression de chaque VE-cadhérine mutante est extrêmement bas. En effet, le taux d'expression des VE-cadhérines murines mutantes atteint péniblement les 10 %. Même si la transfection des siRNA VE-cadhérines touche la quasi-totalité des cellules, l'analyse des phénotypes angiogéniques propres à chaque VE-cadhérine mutante semble très fortement compromise. De plus, en parallèle de ces résultats, l'analyse de la capacité migratoire des cellules HUVECs, exprimant une des 4 VE-cadhérine et transfecté avec le siRNA, a été étudié dans le modèle de fermeture de blessure d'une monocouche de cellule (non montré). Comme observé

précédemment, au vu du nombre très faible de cellules exprimant la VE-cadhérine murine mutante, aucune conclusion n'a pu être tirée, ce qui nous a encore plus conforté dans l'idée d'abandonner cette technique de transfection.

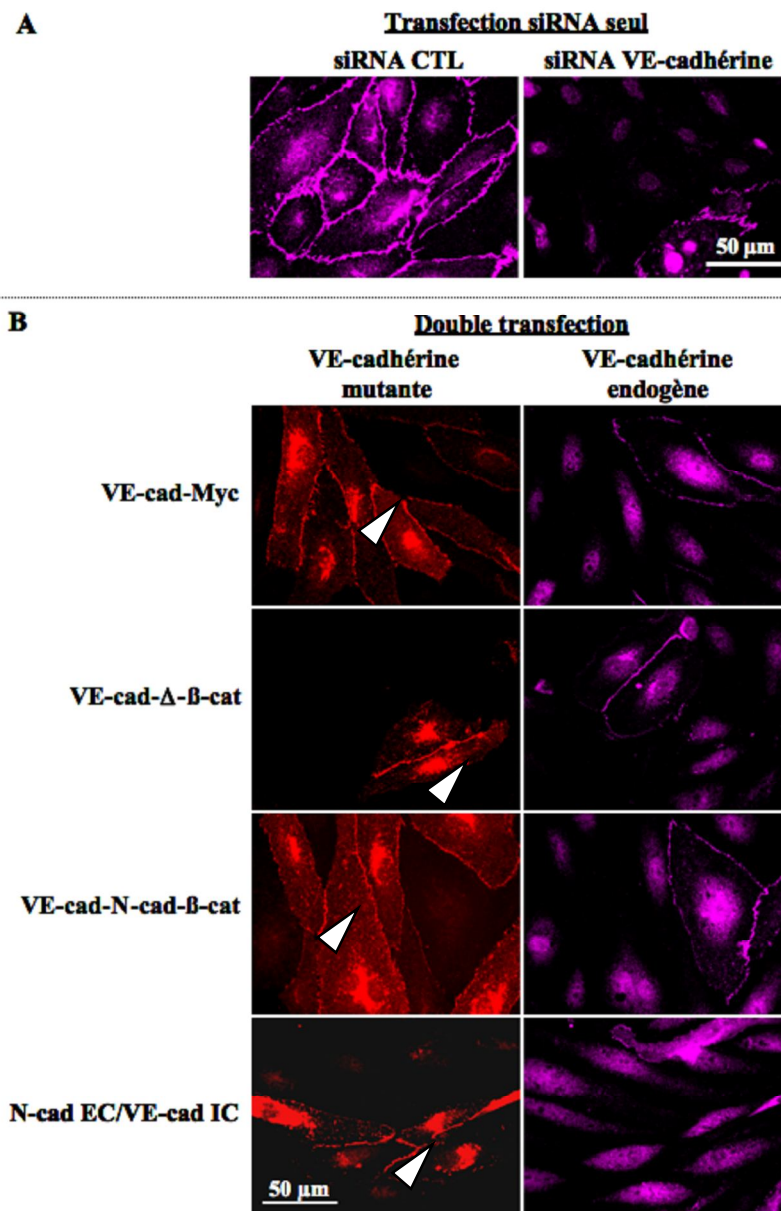


Figure 43 : L'inhibition de l'expression de la VE-cadhérine par les siRNA VE-cadhérine n'empêche pas l'expression des différentes VE-cadhérine mutantes

Les cellules HUVECs ont été traitées au siRNA VE-cadhérine ou au siRNA contrôle (CTL). 24 heures après la transfection, les cellules sont fixées puis perméabilisées. Elles sont par la suite marquées avec un anticorps anti-VE-cadhérine humaine (A). Les HUVECs ont été transfectées à la fois par une des constructions de VE-cadhérine mutante et par le siRNA VE-cadhérine. 48 heures après la transfection, les cellules sont fixées puis perméabilisées. Elles sont par la suite co-marquées avec un anticorps anti-VE-cadhérine humaine (violet) et avec un anticorps anti-VE-cadhérine murine (en rouge) (B).

5. Discussion et perspectives

Analyse des modèles d'angiogenèse *in vitro*

Dans un premier temps, nous avons mis au point trois modèles d'angiogenèse *in vitro* représentés par le modèle sphéroïde bourgeonnant, le modèle matrigel et le modèle de vacuolisation. Pour chacun des modèles analysés, le phénotype angiogénique déficient en VE-cadhérine a été analysé. Tout d'abord, comme l'avaient montré Korff et Augustin, (Korff and Augustin, 1998) (Korff and Augustin, 1999), les HUVECs peuvent former des sphéroïdes qui bourgeonnent une fois placés dans une matrice de collagène I. De plus, la VE-cadhérine semble être essentielle pour la formation des bourgeons endothéliaux. Les résultats obtenus dans ce modèle sont semblables à ceux publiés dans le modèle de différenciation à partir des cellules ES (Vittet et al., 1997).

Depuis de nombreuses années, le matrigel représente un test d'angiogenèse *in vitro* de référence. Les cellules HUVECs, placées dans cette matrice, forment spontanément des structures précapillaires (Maheshwari et al., 1991). L'équipe de Imamura a montré le rôle clé de la VE-cadhérine dans l'organisation des structures précapillaires (Matsuyoshi et al., 1997). En effet, les anticorps dirigés contre le domaine EC-1 de la VE-cadhérine bloquent la formation de telles structures. Nous avons également mis en évidence de tels résultats en constatant que l'absence de VE-cadhérine provoquait une désorganisation des structures capillaires.

Enfin, la formation de la lumière endothéliale peut être analysée dans un modèle de vacuolisation en collagène I. Une étude précédente a clairement montré que la VE-cadhérine participait à la fusion de petites vacuoles, en vacuoles plus grosses. Ceci car l'utilisation d'anticorps dirigés contre la VE-cadhérine bloquait la fusion des petites vacuoles, et donc bloquait la formation de la lumière endothéliale (Yang et al., 1999).

Notre étude a permis de montrer un tel phénomène dans des HUVECs déficientes en VE-cadhérine. Ainsi, la VE-cadhérine serait impliquée dans la fusion vacuolaire. Par ailleurs, l'étude de la localisation de la VE-, de la N-cadhérine, et de PECAM a montré que ces protéines présentaient des localisations attendues. Ainsi, pour les 3 modèles testés, l'absence de VE-cadhérine bloquerait la formation de structures angiogéniques.

Analyse des cellules doublement transfectées.

Dans un second temps, nous avons analysé l'expression des VE-cadhérine mutantes au sein des HUVECs. Des études préliminaires réalisées au cours du DEA de Stella Oun, avaient montré que les 4 VE-cadhérine mutantes étaient exprimées de manière équivalente et se transloquaient correctement à la jonction intercellulaire des cellules CHO (résultats non montrés). Nos expériences ont montré des résultats semblables et ceci dans des cellules endothéliales

HUVECs. En effet, les VE-cadhérine mutantes exprimées dans des cellules HUVECs se plaçaient aux contacts interendothéliaux (non montrés). De plus, nous avons mis en évidence qu'il était possible de transfecter les HUVECs avec deux molécules : le plasmide pcDNA3.1 codant pour une des quatre VE-cadhérine et le siRNA contrôle, ou dirigé contre la VE-cadhérine. Ces cellules pouvaient ainsi à la fois exprimer une des quatre VE-cadhérine mutantes tout en ayant l'expression pour la VE-cadhérine endogène régulée négativement suite au traitement au siRNA. Également, nous avons montré que la localisation des 4 VE-cadhérines mutantes n'était pas perturbée par le siRNA VE-cadhérine puisqu'elles étaient toujours localisées à la jonction.

Néanmoins, bien que la quasi-totalité des cellules aient reçu le siRNA, les cellules exprimant la VE-cadhérine mutante sont trop peu nombreuses pour que l'analyse de leur phénotype angiogénique ait pu être réalisé et soit interprétable. Ces différences d'expression pourraient être expliquées par la taille des molécules transfectées. En effet, le siRNA est une très petite molécule. Il peut ainsi passer allègrement les pores membranaires formés au cours de la nucléofection. Le plasmide contenant le cDNA les constructions des VE-cadhérine mutantes est une molécule beaucoup plus grosse. Cette taille importante constituerait un obstacle pour le passage au travers des pores. Ainsi, très peu de cellules recevraient le plasmide.

Afin de continuer cette étude, la méthode de transfection devra être modifiée. La transduction virale par rétrovirus ou lentivirus semblerait être la technique la plus adaptée pour augmenter le taux de transfection, puisque chaque particule virale peut cibler une cellule. De plus, le génome contenu dans la particule virale peut s'insérer directement dans le génome de la cellule hôte. Ceci permettrait alors une expression du gène d'intérêt à plus long terme. Le plasmide pcDNA3.1 contenant les cDNAs devrait néanmoins être changé car il n'est pas un plasmide adapté pour la transduction virale. Malheureusement, faute de temps, nous n'avons pu changer de stratégie de transfection.

II. Régulation de l'expression de la protéine PECAM par la VE-cadhérine.

1. Contexte scientifique

Au cours de l'étude portant sur la délocalisation de la N-cadhérine des jonctions par la VE-cadhérine, nous avons utilisé un modèle de différenciation cellulaire issu des cellules ES (modèle de corps embryoides, EB). Le modèle EB est un modèle tout à fait intéressant qui possède de nombreux avantages. Il permet notamment d'étudier des cellules dont le génotype est modifié, et donc d'analyser les conséquences de l'extinction des gènes connus pour être impliqués dans le développement vasculaire.

Dans ce contexte, notre laboratoire dispose de cellules ES dont les deux allèles de la VE-cadhérine sont invalidés (Vittet et al., 1997). Ces cellules, placées dans une matrice inerte de méthylcellulose et en présence de facteurs de croissance, forment des EB contenant 10 à 20% de cellules exprimant des marqueurs endothéliaux. PECAM, ou CD31, sont des marqueurs de choix pour analyser la différenciation endothéliale. En étudiant les EB formés à partir de cellules ES déficientes en VE-cadhérine, nous nous sommes aperçus que l'expression de PECAM était fortement inhibée. Nous avons ainsi étudié ce mécanisme de régulation. Tout d'abord, nous avons analysé la quantité de protéine PECAM et le taux d'ARNm de PECAM au cours d'une cinétique de différenciation des EB. Les résultats indiquent que l'absence de VE-cadhérine induit une la régulation négative de la transcription des ARNm correspondants à PECAM. Nous nous sommes également intéressés aux mécanismes moléculaires de cette régulation d'expression, notamment en analysant une possible régulation épigénétique du gène *PECAM*. Nous avons voulu également étudier ce mécanisme dans un modèle cellulaire déjà différencié : le modèle HUVEC.

2. Matériel et méthodes

Anticorps utilisés

Pour les expériences de western-blot et les expériences d'immunofluorescence, les protéines murines ont été révélées grâce aux anticorps anti-VE-cadhérine de lapin (anticorps polyclonal dirigé contre un peptide de la partie C-terminale de la molécule), anti-VE-cadhérine de rat (clone « 11D4.1 », BD Pharmingen), anti-N-cadhérine de souris (clone « 3B9 », Zymed Laboratories), anti-N-cadhérine de souris (clone « 32 », BD Pharmingen) anti-PECAM-1 de

souris (R&D Systems), anti-PECAM de rat (hybridome de rat « Mec-13 »), anti-histone H3 acétylé () et anti- β -tubuline de souris (Sigma).

Les protéines humaines ont été détectées grâce aux anticorps anti-VE-cadhérine de souris (« BV9 »), anti-PECAM-1 de chèvre (« M-20 », Santa Cruz Biotechnology) et anti- β -actine de souris (clone « AC-15 », Sigma).

Culture des cellules ES et HUVEC

Les cellules ES de type sauvage (CJ7) ou dont les deux allèles pour la VE-cadhérine ont été invalidés (VE-/-), sont cultivés sur boîtes recouvertes par de la gélatine 0,1% et cultivées dans du milieu DMEM supplémenté par 15% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% d'ATAM, 0,45 mM de monothioglycérol (MTG) et de 1000 U/ml de Leukemia inhibitory factor (LIF) permettant de maintenir ces cellules dans un stade indifférencié.

Les HUVECs sont cultivées et transfectées par les siRNA de la même manière que dans la partie : « matériel et méthode » (partie résultat, I, B, 3, a (p92))

Différenciation des EBs

La différenciation des cellules ES est initiée par l'ensencement de 2000 cellules en suspension dans un gel semi-solide de méthylcellulose à 2% préparé dans de l'iscove (IMDM), supplémenté par 15% de SVF, 10 μ g/ml d'insuline, 50 U/ml de pénicilline, 50 μ g/ml de streptomycine, 0,45 mM de MTG, et des facteurs de croissances angiogène (VEGF 50 ng/ml, FGF₂ 100 ng/ml).

Après 3, 5, 7, 10 jours de différenciation, les EBs sont récoltés dans du PBS 1X, puis lysés pendant 20 min sur glace par un tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH 7,4) contenant 150 mM de NaCl, 1% de NP-40, 1% de triton X-100, 1mM d'EDTA et un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche). Le lysat cellulaire est centrifugé à 14000 trs/min pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est dosé par le kit MicroBCA (Pierce).

Extraction des ARN et PCR quantitative des EBs

Les ARN totaux sont extraits grâce au kit « Nucleospin RNA II kit » (Macherey-Nagel). Les EBs dissociés sont filtrés au travers d'une membrane de silicate contenue dans un des filtres du kit Nucleospin. Après dessalement et traitement à la DNase I, les ARN totaux purs sont élués dans de l'eau. La concentration d'ARN est déterminée par un spectrophotomètre (bioPhotomètre, Eppendorf).

La PCR quantitative est réalisée grâce à un LightCycler (Roche Diagnostics) et grâce à l'utilisation d'un mix PCR prêt à être utilisé « FastStart DNA master SYBR Green I » (Roche

Diagnosics), selon le protocole fourni par le fournisseur. Les ADNc sont amplifiés dans une réaction de PCR contenant un volume total de 20 µl avec des amorces spécifiques pour flk-1, tie-1 et PECAM et des amorces spécifiques pour la déhydrogénase phosphate glycéraldéhyde (GAPDH). L'amplification des ADNc est réalisée grâce à une pré-incubation à 95°C pendant 10 min, suivie de 45 cycles se déroulant de la manière suivante : 10 sec à 95°C, 10 sec à 58°C et 15 sec à 72°C. À partir des produits PCR issus de chaque paire d'amorce, une courbe de fusion est établie puis analysée. L'expression des gènes est normalisée en utilisant les valeurs obtenues pour le gène de ménage : GAPDH. Les calculs sont réalisés suivant le manuel du fournisseur en utilisant le programme de quantification relative : « Relquant » du LightCycler (Roche Diagnostics) Les amorces utilisés (Invitrogen) sont les suivantes :

Flk-1 :

mFlk-1 S1254 :	5'-TGTCCGAGTTCACACAAAGC-3'
mFlk-1 AS1496 :	5'-TTGGTGAGGATGACCGTGTA-3'

tie-1 :

tie 1 S31	5'-GGCAGCTTCCAGAGTATGGT-3'
tie 1 AS133	5'-TGGCCAGCAATGTTAAGTCA-3'

PECAM-1 :

mPECAM S211	5'-TGAATGGGCAGCAACTGA-3'
mPECAM AS475	5'-GTCACCTTGGGCTTGGATAC-3'

VE-cadhérine

mVe-cad P53 S	5'-GGACAGACTGCAGRGGAGAG-3'
mVe-cad P41 AS	5'-TCTCTTCATCGATGTGCATT-3'

Traitement des EBs par la trichostatine A.

Après 7 jours de différenciation, une solution d'IMDM (Invitrogen) contenant de la TSA (Sigma) est ajoutée au milieu de culture des EBs des deux différents génotypes, de manière à obtenir une concentration finale de TSA de 32 nmol/L. Au bout de 3 heures de traitement, les EBs sont récoltés et lavés dans du PBS 1X.

Les EBs sont ensuite lysés à 4°C pendant 20 min par une solution de lyse (Tris 20 mM pH 7,4) contenant 1% de SDS, 150 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche).

Les lysats cellulaires sont centrifugés à 14000 trs/min pendant 20 min à 4°C. Les surnageants sont dosés par le kit MicroBCA (Pierce). Pour les histones acétylés, 5 µg de protéines sont déposés sur gel de polyacrylamide. Pour l'analyse de la protéine PECAM et la tubuline, 50 µg de protéines sont déposés sur gel de polyacrylamide.

Adhérence des EBs

Après 6 jours de différenciation en milieu liquide, les EBs formés sont récoltés et déposés sur des boîtes de culture cellulaire recouvertes de gélatine (1%). Les EBs sont, soit analysés en immunofluorescence, soit en western-blot après 1, 2 ou 3 jours d'adhérence selon les protocoles classiques.

3. Résultats

a. Étude dans un modèle de différenciation endothéliale dérivée des cellules ES.

♦ Analyse protéique

Afin d'étudier le contrôle de l'expression de PECAM au cours du développement, une cinétique de différenciation a été réalisée à partir d'EBs issus de cellules souches embryonnaires sauvages ou déficientes en VE-cadhérine (**Cf. Figure 44**).

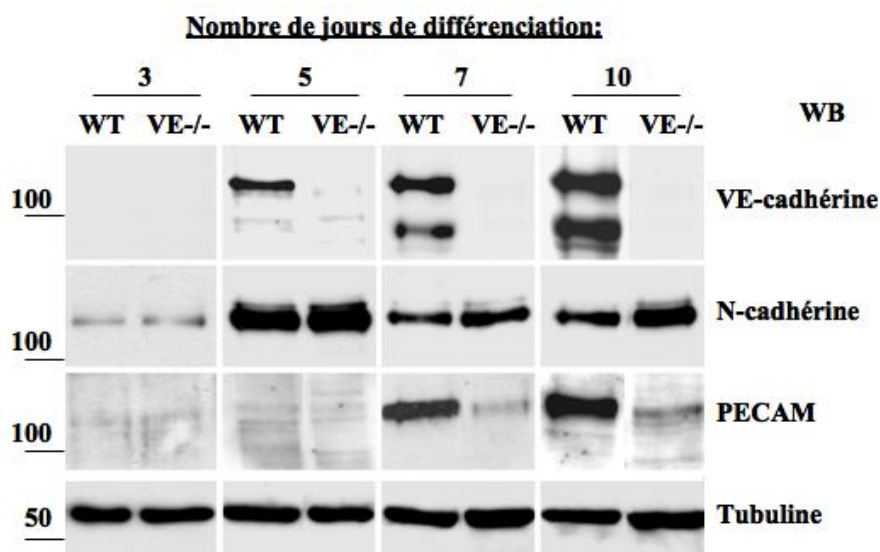


Figure 44 : L'absence de VE-cadhérine régule négativement l'expression de PECAM.

Les cellules souches embryonnaires de souris sauvages (WT) ou déficientes en VE-cadhérine (VE -/-) ont été mises en différenciation en méthylcellulose en présence de facteur de croissance (VEGF et FGF). Les corps embryoides ainsi formés ont été récoltés au bout de 3, 5, 7, 10 jours de différenciation, lysés et 50 µg de protéines ont été analysées par western blot avec des anticorps anti-PECAM, anti-VE-cadhérine, anti-N-cadhérine et anti-tubuline qui permet de normaliser la quantité de protéines déposés sur un gel.

Les résultats montrent que dans ce système de différenciation, la protéine PECAM n'est pas détectée à J5, alors que la VE-cadhérine est déjà présente. La N-cadhérine, quant à elle, est exprimée plus précocement (à partir de J3). Cette quantité de N-cadhérine est sensiblement la même tout au long de la différenciation dans les deux génotypes et représente donc un contrôle interne. Après 7 jours de différenciation, les cellules déficientes en VE-cadhérine présentent une diminution de la quantité de protéine PECAM comme le montre la bande de très faible intensité correspondant à PECAM. Une analyse densitométrique a permis d'établir une baisse de la quantité de PECAM de 70% dans le phénotype déficient en VE-cadhérine comparé au phénotype sauvage. Cette diminution est également observée à des stades de développement plus tardifs (10 jours). De plus, de tels résultats ont été obtenus dans d'autres clones d'ES (sauvages ou déficients en VE-cadhérine), tous différenciés dans les mêmes conditions. Ces résultats indiquent clairement que la déficience en VE-cadhérine a une influence négative sur le niveau d'expression de la protéine PECAM. Curieusement, une étude précédente avait montré, par cytométrie de flux, que le nombre de cellules positives pour le marquage PECAM était sensiblement le même pour les deux génotypes (Vittet et al., 1997) permettant de supposer que la

déficiences en VE-cadhérine n'affectait pas la différenciation endothéliale. Dans ce contexte, nos résultats sont surprenants, mais strictement reproductibles. Par conséquent, nous supposons que le niveau d'expression de la protéine PECAM, dans chacune des cellules endothéliales, est considérablement affecté, même si la vasculogenèse se déroule normalement. Pour cela, nous avons analysé le niveau d'ARNm codant pour PECAM dans les deux génotypes.

◆Analyse des ARNm PECAM

Afin de déterminer si la diminution de la détection de la protéine PECAM est due à un défaut de transcription, des PCRs quantitatives ont été réalisées à partir des ARNm PECAM (**Cf. Figure 45**). Au cours de cette étude, Mme Prandini Marie-Hélène s'est chargée de réaliser les PCRs quantitatives.

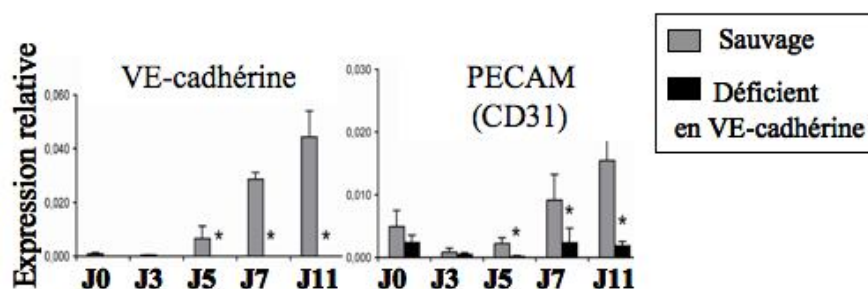


Figure 45 : La déficience en VE-cadhérine induit une baisse des ARNm codant pour la protéine endothéliale PECAM (CD31)

Les corps embryoides sauvages (WT) ou déficients en VE-cadhérine (VE -/-) ont été collectés avant la différenciation (J0) et après 3, 5, 7, 11 jours de différenciation (J3, J5, J7, J11) en présence de VEGF et de FGF. Les ARNm ont été extraits puis analysés par PCR quantitative à l'aide d'un light cycler. Les résultats sont exprimés en expression relative standardisée par le gène de ménage : *gadh*. Les étoiles indiquent les différences statistiquement significatives entre les EB sauvages et déficients en VE-cadhérine.

Comme attendues, les cellules déficientes en VE-cadhérine ne synthétisent pas d'ARNm correspondant à la VE-cadhérine. Par contre, les ARNm correspondant à la VE-cadhérine des cellules sauvages apparaissent à J5, et augmentent progressivement jusqu'à J11 de développement. Dans les EBs sauvages, les ARNm PECAM sont détectés dans les cellules ES non différenciées (J0). Il est classique qu'une autre isoforme de PECAM soit exprimée dans ces cellules. L'expression de CD31 diminue au troisième jour de développement. L'expression de la

protéine PECAM endothéliale augmente par la suite progressivement. Les ARNm PECAM des EB déficients en VE-cadhérine présentent une cinétique assez similaire, cependant la quantité des ARNm est très fortement diminuée. En effet, à J11, la diminution de la quantité d'ARNm PECAM est de 80%. L'absence de VE-cadhérine induit donc une diminution drastique des ARNm PECAM. Ceci laisse supposer que cette cadhérine régule la quantité de PECAM au travers d'une régulation transcriptionnelle du gène PECAM, ou au travers d'une régulation de la stabilité de cet ARNm.

Afin de savoir si l'activité régulatrice de la VE-cadhérine se limitait et était spécifique de PECAM, les ARNm d'autres gènes endothéliaux ont été analysés. Ainsi, les ARNm du récepteur 2 au VEGF (Flk-1) et les ARNm du récepteur Tie-1 ont été analysés (**Cf. Figure 46**). En absence de VE-cadhérine, une diminution significative de l'expression de ces gènes est également observée. L'ensemble de ces résultats montre que la déficience en VE-cadhérine induit une régulation négative du niveau de transcription de plusieurs gènes endothéliaux.

Ainsi, nos résultats suggèrent que la VE-cadhérine gouverne et régule l'expression des gènes endothéliaux. Afin de comprendre comment la VE-cadhérine régule cette expression, nous avons cherché à identifier les mécanismes de régulation de cette expression.

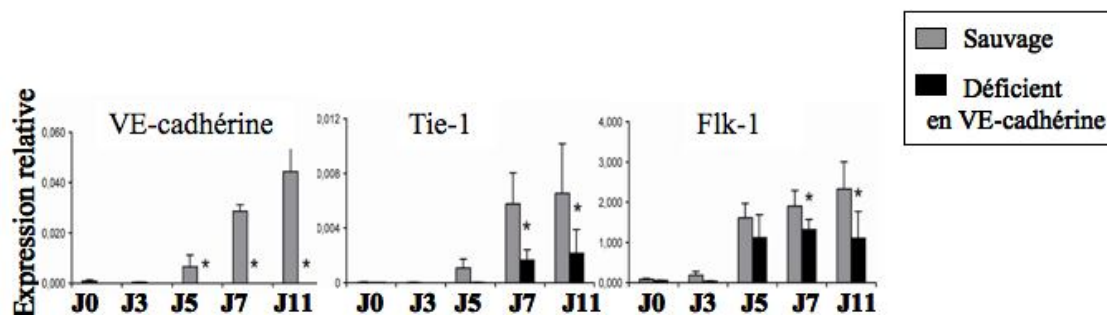


Figure 46 : La déficience en VE-cadhérine induit une baisse des ARNm codant les endothéliales Tie-1 et Flk-1

Les corps embryoides sauvages (WT) ou déficients en VE-cadhérine (VE -/-) ont été collectés avant la différenciation (J0) et à 3, 5, 7, 11 jours de différenciation (J3, J5, J7, J11). Les ARNm ont été extraits puis analysés par PCR quantitative à l'aide d'un light cycler. Les résultats sont exprimés en expressions relatives standardisées par le gène de ménage : *gapdh*. Les étoiles indiquent les différences statistiquement significatives entre les EB sauvages et déficients en VE-cadhérine.

◆ Étude du mécanisme de régulation

• Analyse épigénétique de l'expression de PECAM

Le mécanisme, par lequel la déficience en VE-cadhérine peut moduler l'expression de la protéine PECAM, a été étudié. Il est connu que l'expression des gènes peut être régulée par des mécanismes épigénétiques faisant intervenir des modifications de l'organisation de la chromatine (Ribatti et al., 2009) (Matouk and Marsden, 2008) (Illi et al., 2005). Ainsi, l'acétylation est connue pour rendre active des régions transcriptionnellement silencieuses. Une étude en particulier a montré que de tels mécanismes pouvaient être mis en jeu au cours de la différenciation des cellules ES (Illi et al., 2005) en cellules cardiaques. Nous avons ainsi voulu analyser si la régulation de l'expression de PECAM par la VE-cadhérine passait par une régulation épigénétique du gène PECAM. En particulier, une modification du niveau d'acétylation des histones pourrait éventuellement corrélérer avec une modification du niveau d'expression de PECAM. Basée sur ce principe, la quantification de la protéine PECAM, suite à l'inhibition des histones désacétylases (HDAC) par un traitement à la tricostatine A (TSA) a été réalisée. Cette molécule inhibe l'activité des HDACs, et permet le maintien voire l'augmentation de l'état acétylé de la chromatine. La quantité de protéine PECAM a été analysée en western blot suite au traitement à la TSA (Cf.

Figure 47). Comme déjà mentionné, en absence de traitement, les EBs sauvages présentent une quantité de protéines PECAM beaucoup plus élevée que les EBs déficients en VE-cadhérine.

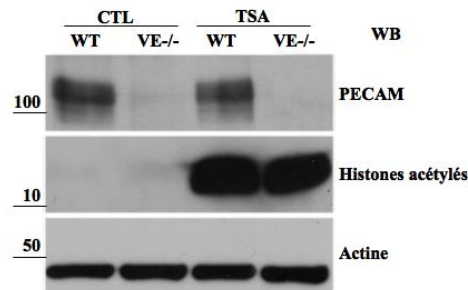


Figure 47 : La régulation de l'expression de PECAM par la VE-cadhérine n'est pas corrélée au niveau d'acétylation des histones

Après 7 jours de différenciation, les corps embryoides (EB) sauvages (WT) ou déficients en VE-cadhérine (VE-/-) sont traités avec de la Trichostatine A (32 mmol/L) pendant 3 heures puis lysés. Les protéines sont dosées et 5 µg de protéines sont séparés sur gel. Les protéines sont révélées grâce à des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine PECAM, les histones H3 acétylés, ou l'actine qui permet de normaliser la quantité de protéines.

Le signal correspondant à la bande de la protéine PECAM au sein du corps embryoides déficient en VE-cadhérine est même difficile à distinguer. Le traitement à la TSA induit bien une augmentation de l'acétylation des histones et ceci dans les deux génotypes. Cette observation montre que le traitement a été efficace et que la chromatine se trouve dans un état différent que la chromatine non traitée. Cependant, la figure 46 montre que ce traitement ne lève en aucun cas l'inhibition d'expression de PECAM en absence de VE-cadhérine. En effet, l'expression de PECAM est à peine détectable que les EB aient été traités ou non à la TSA. Ces résultats montrent que la régulation de l'expression de PECAM est dépendante de la VE-cadhérine mais n'implique pas de variation d'acétylation des histones comme mécanisme de régulation.

- **Influence de l'adhérence à la MEC sur la régulation de l'expression de PECAM**

Afin de faciliter les conditions de travail à partir des EBs et notamment de pouvoir faire subir différents traitements aux cellules en différenciation, nous avons par la suite cultivés ces cellules en conditions liquides puis fait adhérer les EBs sur une matrice extracellulaire constituée de gélatine ou de collagène IV. L'adhérence des EBs à la matrice permet alors de réaliser des marquages en immunofluorescence, plus facilement analysable (**Cf Figure 48**).

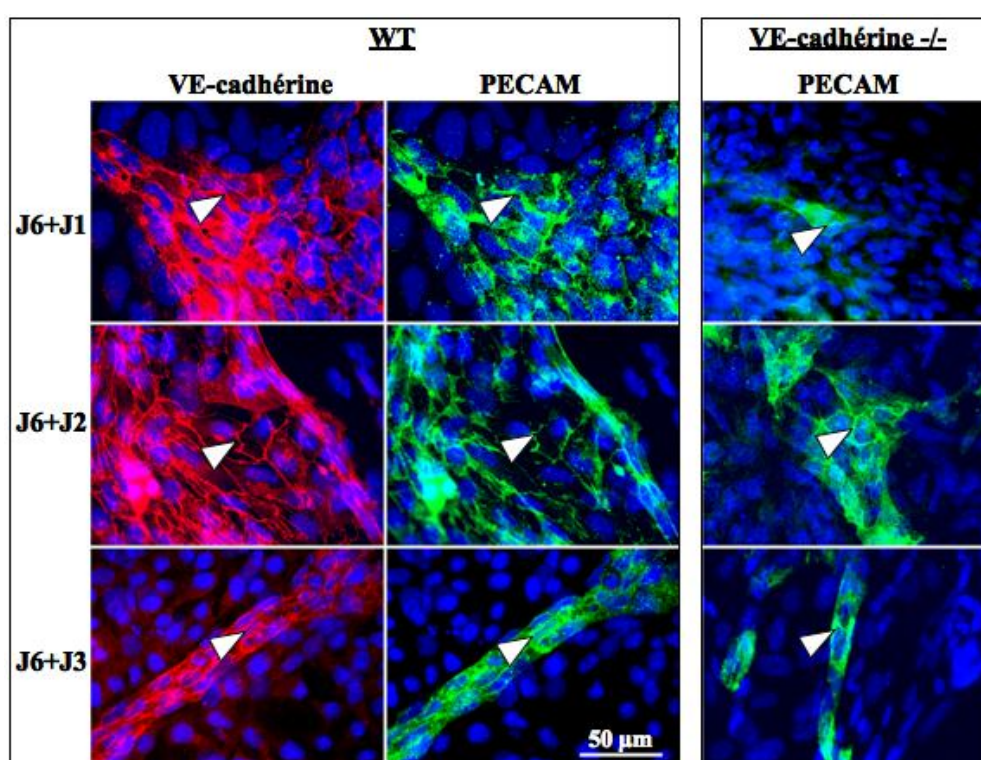


Figure 48 : Localisation de la VE-cadhérine et de la protéine PECAM au sein de corps embryoides sauvages (WT) ou déficients en VE-cadhérine (VE-cadhérine^{-/-}) de 6 jours, au bout de 1 (J6+J1), 2 (J6+J2) ou 3 (J6+J3) jours d'étalement

Les corps embryoides sauvages ou déficients en VE-cadhérine de 6 jours sont mis à adhérer sur boîte gélatinée. Au bout de 1, 2 ou 3 jours de culture, les corps étales sont fixés puis perméabilisés. Les cellules sont co-marquées avec des anticorps anti-VE-cadhérine et anti-PECAM. Les noyaux ont été colorés au bleu de Hoechst.

Les EBs ont donc été marqués après 1, 2 ou 3 jours d'adhérence à la matrice, ce qui permet de visualiser *in situ*, la proportion de cellules différenciées vers la voie endothéliale. On distingue clairement que les cellules endothéliales de ce système coexpriment la VE-cadhérine et

la protéine PECAM (voir flèches blanches) dans des structures qui s'organisent sous forme de « bourgeons endothéliaux » après 3 jours de culture. Curieusement, cette technique ne mettait pas en avant les différents niveaux d'expression de PECAM en présence ou non de VE-cadhérine. On observe, en effet, un signal intense dans les cellules PECAM positives du génotype déficient en VE-cadhérine après 2 ou 3 jours d'adhérence sur matrice (Cf. **Figure 48**).

Par conséquent, l'expression de PECAM a été de nouveau analysée dans les différentes conditions de culture en western-blot (Cf **Figure 49**).

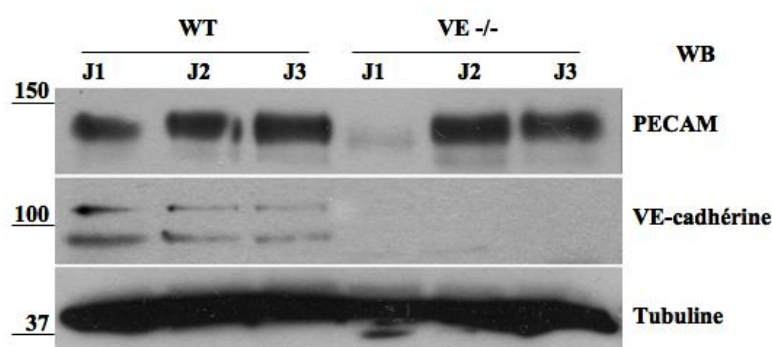


Figure 49 : L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire semble être impliquée dans le mécanisme de régulation de l'expression de PECAM VE-cadhérine dépendante

Après 6 jours de différenciation, les corps embryoides sauvages ou mutants sont mis à adhérer dans des boîtes de culture recouvertes de gélatine pendant 1, 2 et 3 jours. Ces corps étalés sont ensuite lysés et les protéines sont dosées. 50 µg de protéine sont analysées sur gel. La protéine PECAM, la VE-cadhérine et la tubuline sont ensuite détectées par des anticorps spécifiques. La tubuline constitue le témoin interne de l'expérience et permet la normalisation de la quantité de protéines.

De manière spectaculaire, on observe que l'inhibition d'expression de PECAM observée à J1 dans les cellules déficientes en VE-cadhérine est totalement levée après 2 ou 3 jours d'adhérence sur la MEC. Par conséquent, le phénotype observé est totalement dépendant d'une culture en trois dimensions puisque l'inhibition de PECAM des cellules déficientes en VE-cadhérine n'est observée que dans des EBs cultivés en milieu semi-solide ou en milieu liquide (non montré). On peut dès lors suggérer que ce n'est pas l'absence de VE-cadhérine qui diminue PECAM, mais l'absence d'un signal d'adhérence qui engagerait des voies de signalisation communes entre cadhérine et intégrine. Ainsi, l'engagement des intégrines pourrait suppléer à l'absence de VE-cadhérine.

Afin d'infirmer ou confirmer ces hypothèses, nous avons procédé à des analyses *in vivo* dans des embryons de souris déficients ou non en VE-cadhérine. Cependant, nous nous sommes heurtés à de nombreux problèmes techniques (difficulté d'obtention de grandes quantités d'embryons déficients pour l'analyse biochimique, manque de reproductibilité des résultats de PCR quantitative) qui ne nous ont pas permis de conclure de manière fiable quant à la possible régulation de l'expression de PECAM par la VE-cadhérine.

Par conséquent, nous avons analysé une régulation potentielle similaire dans un autre modèle cellulaire : les HUVECs.

b. Expression de PECAM dans des HUVECs déficientes en VE-cadhérine.

Afin de confirmer, dans un autre modèle cellulaire, que la VE-cadhérine est une protéine régulatrice du taux de PECAM, cette dernière a été analysée après extinction de la VE-cadhérine par des siRNA dans des HUVECs (**Cf. Figure 50**). Comparée au siRNA contrôle, le traitement au siRNA VE-cadhérine réprime bien l'expression de cette cadhérine. Contrairement à ce qui a été observé dans les EBs déficients en VE-cadhérine, l'inhibition de l'expression de la VE-cadhérine ne conduit pas à une extinction mais plutôt à une augmentation de l'expression de la PECAM. Ces résultats ont pu être reproduits 2 fois.

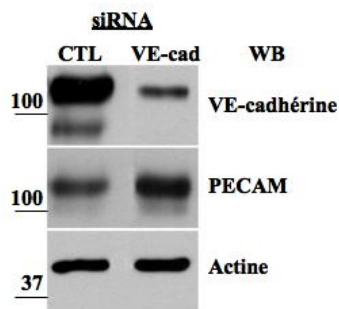


Figure 50 : L'inhibition de l'expression de la VE-cadhérine dans les HUVECs régule positivement l'expression de la protéine PECAM

Les cellules HUVECs ont été transfectées avec un siRNA contrôle (CTL) ou bien avec un siRNA VE-cadhérine. 24 heures après la transfection, les cellules ont été lysées, les protéines quantifiées. 10 µg de protéines ont été analysées sur gel de polyacrylamide. La VE-cadhérine, PECAM et l'actine ont été révélées grâce à des anticorps spécifiques.

L'actine a permis de normaliser la quantité de protéines déposée dans chacun des puits.

Ainsi, contrairement aux cellules endothéliales des EB, dans les cellules endothéliales matures et adhérentes, la VE-cadhérine régulerait négativement l'expression de la protéine PECAM. Les cellules HUVECs présentent donc un autre système de régulation de l'expression de PECAM différent de celui des EBs.

4. Discussion et perspectives

Expression de PECAM au cours du développement

De manière inattendue, suite à l'analyse de marqueurs protéiques exprimés dans des EBs, nous avons ainsi mis en évidence que la VE-cadhérine pouvait réguler le niveau d'expression de la protéine PECAM. Le modèle de différenciation cellulaire dérivé des cellules ES est particulièrement intéressant notamment pour étudier l'importance de certains gènes au cours du développement vasculaire. En effet, ce modèle récapitule parfaitement les étapes clés du développement vasculaire. Dans un premier temps, la formation du corps embryotaire à partir de cellules souches embryonnaires murines permet la différenciation de progéniteurs endothéliaux et permet ainsi de récapituler les étapes de la vasculogénèse. La formation de bourgeons endothéliaux à partir du corps embryotaire mime les processus spécifiques de l'angiogénèse. Nous avons montré que dans ce modèle, l'inactivation de la VE-cadhérine était corrélée à une diminution très significative du niveau d'expression d'une autre molécule d'adhérence : la protéine PECAM. Comme l'avait montré une étude précédente, la déficience en VE-cadhérine ne bloque pas la différenciation endothéliale des cellules souches embryonnaires puisque le nombre de cellules endothéliales des deux génotypes est sensiblement le même (Vittet et al., 1997). Cependant, cette étude était peu quantitative dans la mesure où elle n'analysait pas le niveau d'expression des gènes endothéliaux mais plutôt la présence de cellules différenciées en présence des facteurs de croissance adéquats. La régulation de l'expression s'expliquerait donc par une baisse globale du taux de protéine PECAM à la surface de la cellule. De plus, le taux de PECAM a été également analysé dans des EBs déficients en VE-cadhérine formés à partir de différents clones de cellules ES (non montré). Ces EBs ont tous présenté une régulation négative de l'expression de PECAM suggérant que ce mécanisme n'est pas spécifique à un clone particulier. Des analyses par PCRs quantitatives ont montré que cette régulation passait par une régulation transcriptionnelle du gène PECAM. En effet, en absence de VE-cadhérine, la quantité des ARNm PECAM est fortement diminuée. En outre, il semblerait que la déficience en VE-cadhérine touche l'expression d'autres gènes endothéliaux comme Flk-1 et Tie-1. Nous n'avons cependant pas pu confirmer ces résultats au niveau protéique car nous ne disposons pas d'anticorps efficaces en western-blot contre ces protéines.

Dans un second temps, nous avons voulu décrypter le mécanisme moléculaire responsable de cette régulation. Peu de choses concernant la régulation de l'expression de PECAM sont actuellement connues. Nous avons alors analysé cette régulation dans le cadre d'une régulation de l'expression globale des gènes caractérisée par des modifications épigénétiques de la chromatine. Des études précédentes ont déjà montré que l'expression de

certaines gènes endothéliaux comme le gène codant pour l'enzyme de synthèse de l'oxyde nitrique endothélial (eNOS) (Gan et al., 2005), pour le facteur de von Willebrand (Peng and Jahroudi, 2003) et pour la protéine notch4 (Wu et al., 2005) pouvait être régulée par de telles modifications chromatinienne. Ces modifications d'expression sont en fonction de l'état compacté de la chromatine. En effet, il est connu que l'acétylation des histones H3 décompacte la chromatine ce qui la rend alors plus accessible aux facteurs de transcription. Une autre étude a notamment montré que des modifications de l'acétylation des histones de la chromatine, suite à un stress par cisaillement laminaire, étaient corrélées à un engagement des cellules ES dans la voie de différenciation cardiaque. Ces cellules exprimaient alors des marqueurs protéiques typiques des cellules cardiaques (VEGFR-2, MEF2C (myocyte enhancer factor-2C, la protéine 22- α du muscle lisse et PECAM) (Illi et al., 2005). Basé sur ces résultats, nous avons voulu montrer l'engagement dans la voie de différenciation des cellules endothéliales et notamment la régulation de l'expression de PECAM par des modifications de l'acétylation des histones. Notre étude a montré que suite à l'inhibition des histones désacétylase aboutissant à une hyper-acétylation des histones par de la TSA, la quantité de PECAM des EBs déficients en VE-cadhérine n'était pas augmentée. La régulation de l'expression de PECAM, contrairement à certains gènes endothéliaux, ne peut s'expliquer par un défaut de compaction chromatinienne.

D'autres hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les résultats obtenus. Il serait possible que la VE-cadhérine puisse réguler le niveau d'activation du promoteur du gène PECAM notamment en favorisant l'association des facteurs de transcription au promoteur. Tout d'abord, le facteur de transcription Gata-2 a été caractérisé pour se lier préférentiellement au promoteur PECAM et de cette manière, activer la transcription du gène PECAM (Gumina et al., 1997). La VE-cadhérine pourrait soit réguler le taux de Gata-2 ou bien réguler l'association de Gata-2 au promoteur PECAM. Il serait donc intéressant d'analyser à la fois le taux de Gata-2 dans des cellules endothéliales d'EBs déficientes de EBs et également la liaison de Gata-2 au promoteur PECAM.

Un autre mécanisme de régulation VE-cadhérine-dépendant pourrait être pressenti. En effet, l'équipe de Dejana a montré que l'expression d'une molécule des jonctions serrées : la claudine-5, était dépendante de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription FoxO-1 (Taddei et al., 2008) (Gavard and Gutkind, 2008). Or, l'activité transcriptionnelle de ce facteur de transcription est contrôlée précisément par la VE-cadhérine. Bien que l'association de FoxO-1 au promoteur PECAM n'aie jamais été décrite, on pourrait cependant imaginer, comme pour la claudine-5, que l'activité transcriptionnelle de FoxO-1 soit contrôlée par la VE-cadhérine, et que ce facteur de transcription puisse induire l'expression de PECAM. Comme pour Gata-2, nous pourrions tout d'abord analyser, dans des EBs déficients ou non en VE-cadhérine, le taux de

FoxO-1 et l'association de ce facteur de transcription au promoteur PECAM dans les EBs déficients en VE-cadhérine.

Enfin, nous avons montré que ce n'est pas la VE-cadhérine elle-même qui contrôle l'expression de PECAM mais plutôt l'adhérence à la MEC. En effet, lorsque l'on restaure l'adhérence des cellules sur une MEC, l'inhibition d'expression de PECAM est levée. Ces résultats peuvent apparaître surprenants. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence le dialogue croisé entre les molécules d'adhérence de la matrice extracellulaire de type intégrine et les cadhérines. Ces deux types de molécule d'adhérence peuvent notamment emprunter des voies de signalisation communes. La première voie commune pourrait être représentée par la voie des MAP kinases. Des études ont notamment montré que l'engagement des cadhérines entre elles (E- et N-cadhérine) ainsi que l'interaction entre molécules d'intégrines endothéliales pouvaient activer cette voie de signalisation aboutissant à une régulation de l'expression génique (Pece and Gutkind, 2000) (Lu and Krauss 2010) (Hulit et al., 2007; Sun et al., 2007). Par exemple, la voie des MAPKs activée par la N-cadhérine permet l'expression de la protéine MMP-9 (Hulit et al., 2007). Les intégrines endothéliales induisent également l'expression de la protéine MMP-9 en passant par la voie de signalisation des MAPK (Sun et al., 2007). Dans les EBs adhérents et déficients en VE-cadhérine, nous pourrions imaginer que PECAM soit de nouveau exprimée grâce à l'activation de la voie MAPK après engagement des molécules d'intégrines. Il serait donc intéressant d'étudier l'état d'activation de cette voie en fonction de l'état adhérent des EB déficients en VE-cadhérine en analysant notamment la forme active de la protéine MAPK c'est-à-dire sa forme phosphorylée.

La voie Wnt- β -caténine peut être une autre voie de signalisation commune aux intégrines et aux cadhérines. Une étude a mis en évidence le rôle clé des intégrines dans la voie de signalisation Wnt- β -caténine permettant ainsi la formation du complexe nucléaire formé des facteurs de transcription Tcf/Lef aboutissant à l'expression de MMP9 (Crampton et al., 2009). Les cadhérines, grâce à leur liaison à la β -caténine, font parties intégrantes de cette voie de signalisation. Cependant, en séquestrant la β -caténine les cadhérines régulent négativement l'expression des gènes. L'expression de PECAM dans les EBs adhérents et déficients en VE-cadhérine pourrait-elle s'expliquer par une activation de la voie Wnt- β -caténine, engendrée suite à l'engagement des intégrines à la MEC ? Afin de répondre à cette question, nous pourrions analyser l'activation de cette voie dans des EBs déficients en VE-cadhérine adhérents ou non en se focalisant par exemple sur la translocation nucléaire de la β -caténine ou la formation du complexe transcriptionnel nucléaire Tcf/Lef. Également, il serait, en parallèle, intéressant d'analyser l'interaction du complexe transcriptionnel Tcf/Lef/ β -caténine au promoteur PECAM.

Néanmoins, la régulation négative de l'expression de PECAM en réponse à la déficience en VE-cadhérine n'a pu être mise en évidence dans les cellules endothéliales primaires en culture :

les HUVECs. En effet, des résultats inverses dans ce modèle ont été obtenus. Ces cellules sont cependant des cellules adhérentes. Dans l'idée que l'absence en VE-cadhérine et l'adhérence à la MEC est un mécanisme pouvant réguler le taux d'expression de PECAM, nous avons essayé d'analyser l'expression de PECAM dans des sphéroïdes d'HUVECs traités ou non par des siRNA VE-cadhérine. Nous n'avons cependant pas obtenu de résultats très concluants car aucune différence du taux de PECAM n'a pu être observé dans les deux types de sphéroïdes.

Ceci suggérerait que ce mécanisme est loin d'être universel.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES

Au final, mon travail de thèse a permis de montrer le rôle déterminant de la VE-cadhérine dans la régulation de l'organisation des molécules d'adhérence. Tout d'abord, des études avaient montré que cette cadhérine, même en présentant des caractéristiques structurales communes à la N-cadhérine, semblait posséder des différences fonctionnelles importantes. Mon travail de thèse a permis de confirmer ces constatations, en apportant toutefois de nouveaux éléments de réponse.

Dans un premier temps, dans plusieurs modèles endothéliaux, le rôle clé de la VE-cadhérine dans la régulation de la localisation de la N-cadhérine a été mis en évidence. En effet, la localisation diffuse de la N-cadhérine et donc originale pour une cadhérine classique, est strictement dépendante de la présence de la VE-cadhérine. De plus, l'association de la VE-cadhérine à la caténine p120 est responsable de cette exclusion jonctionnelle. Par ailleurs, nous n'avons pas pu mettre en lumière un rôle quelconque de la N-cadhérine au cours des étapes de la formation de bourgeons endothéliaux, qu'elle soit engagée ou non dans la jonction adhérente. La fonction angiogénique d'une cadhérine n'est donc pas forcément due à sa localisation jonctionnelle. Au vue de nos résultats, la N-cadhérine semble donc jouer un rôle différent de celui de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse. La localisation jonctionnelle de la N-cadhérine qui semble être corrélée à la fonction angiogénique particulière, ne semble pas dépendre d'une association différente aux caténines (α -, β -, γ -caténine et p120), mais pourrait faire intervenir d'autres partenaires cytoplasmiques comme par exemple des molécules impliquées dans des voies de signalisation telles que SHP-2 ou la kinase Src. Il serait donc intéressant d'analyser tous les partenaires cytoplasmiques de la N-cadhérine jonctionnelle ou non à l'aide d'une étude protéomique.

Notre étude a pu mettre en évidence pour la première fois l'association possible d'une sous-population de VE-cadhérine aux radeaux de cholestérol. La N-cadhérine jonctionnelle ou non, reste en dehors de telles structures. Contrairement aux cellules myoblastiques et aux cellules épithéliales, dans les cellules endothéliales, une molécule d'adhérence jonctionnelle endothéliale n'est donc pas forcément enchassée aux radeaux lipidiques. Nous avons trouvé que la caténine p120 s'associait préférentiellement à la VE-cadhérine des radeaux ce qui pourrait alors constituer une plateforme de stabilité aux contact interendothéliaux. Nous pourrions approfondir l'analyse de la VE-cadhérine associée aux radeaux, notamment en analysant les partenaires cytoplasmiques préférentiels de cette sous-population de VE-cadhérine.

D'autre part, la VE-cadhérine est capable de réguler l'expression d'une autre molécule d'adhérence non associée à des structures jonctionnelles particulières : la protéine PECAM. Ceci a été montré au cours du développement vasculaire dans un modèle de différenciation *in vitro* issu de cellules ES. Cette régulation ne s'arrête pas là et s'étend à des récepteurs à activité tyrosine

kinase fondamentaux pour le développement vasculaire : Tie-2 et Flk-1. En effet, en absence de VE-cadhérine le taux d'ARNm correspondant à PECAM, à Tie-2 et à Flk-1 est très fortement inhibé. Le mécanisme moléculaire permettant la régulation d'expression de ces gènes ne semble pas passer par des modifications épigénétiques notamment au niveau de l'acétylation des histones. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence le mécanisme moléculaire exact permettant d'expliquer ce niveau de régulation. Cependant, nous pourrions analyser le contrôle qu'exerce la VE-cadhérine sur des facteurs de transcription. Nous pourrions ainsi comprendre les conséquences de la déficience en VE-cadhérine sur l'activation et l'association de facteurs de transcription au promoteur du gène PECAM. Le taux et l'activation de Gata-2, connu pour être le facteur de transcription préférentiel du promoteur PECAM, pourrait être étudié. FoxO-1 pourrait être également analysé puisqu'il régule, sous le contrôle de la VE-cadhérine, l'expression d'une molécule d'adhérence : la claudine-5 (Taddei et al., 2008). Comme pour Gata-2, nous pourrions analyser et comparer, dans les EB sauvages ou déficients en VE-cadhérine, le taux de FoxO-1 ainsi que sa liaison au promoteur du gène PECAM. Par ailleurs, nous avons montré que l'engagement différentiel des molécules d'adhérence à la MEC pourrait constituer un mécanisme de régulation surnuméraire de l'expression de PECAM. Il serait possible que l'engagement de molécules d'adhérence à la MEC, comme les intégrines, puissent lever l'inhibition d'expression de PECAM dans des EBs déficients en VE-cadhérine. Nous pourrions imaginer que cette adhérence puisse engendrer l'activation de voies de signalisation communes aux cadhérine et aux intégrines et aboutissant à l'expression des gènes comme par exemple, la voie des MAPK et la voie Wnt. Nous pourrions donc analyser le niveau d'activation de ces deux voies dans des EBs adhérents ou non déficients en VE-cadhérine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, K., and M. Takeichi. 2008. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:13-9.
- Abraham, S., M. Yeo, M. Montero-Balaguer, H. Paterson, E. Dejana, C.J. Marshall, and G. Mavria. 2009. VE-Cadherin-mediated cell-cell interaction suppresses sprouting via signaling to MLC2 phosphorylation. *Curr Biol*. 19:668-74.
- Adam, A.P., A.L. Sharenko, K. Pumiglia, and P.A. Vincent. 2010. Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers. *J Biol Chem*. 285:7045-55.
- Adams, R.H., and K. Alitalo. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:464-78.
- Ahrens, T., M. Lambert, O. Pertz, T. Sasaki, T. Schulthess, R.M. Mege, R. Timpl, and J. Engel. 2003. Homoassociation of VE-cadherin follows a mechanism common to "classical" cadherins. *J Mol Biol*. 325:733-42.
- Aird, W.C. 2007a. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 100:158-73.
- Aird, W.C. 2007b. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 100:174-90.
- Allende, M.L., T. Yamashita, and R.L. Proia. 2003. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*. 102:3665-7.
- Allingham, M.J., J.D. van Buul, and K. Burridge. 2007. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol*. 179:4053-64.
- Anastasiadis, P.Z. 2007. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta*. 1773:34-46.
- Angelini, D.J., S.W. Hyun, D.N. Grigoryev, P. Garg, P. Gong, I.S. Singh, A. Passaniti, J.D. Hasday, and S.E. Goldblum. 2006. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291:L1232-45.
- Angst, B.D., C. Marozzi, and A.I. Magee. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci*. 114:629-41.
- Arnsdorf, E.J., P. Tummala, and C.R. Jacobs. 2009. Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS One*. 4:e5388.
- Arregui, C., P. Pathre, J. Lilien, and J. Balsamo. 2000. The nonreceptor tyrosine kinase fer mediates cross-talk between N-cadherin and beta1-integrins. *J Cell Biol*. 149:1263-74.

- Augustine, C.K., Y. Yoshimoto, M. Gupta, P.A. Zipfel, M.A. Selim, P. Febbo, A.M. Pendergast, W.P. Peters, and D.S. Tyler. 2008. Targeting N-cadherin enhances antitumor activity of cytotoxic therapies in melanoma treatment. *Cancer Res.* 68:3777-84.
- Bachmann, I.M., O. Straume, H.E. Puntervoll, M.B. Kalvenes, and L.A. Akslen. 2005. Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 11:8606-14.
- Balconi, G., R. Spagnuolo, and E. Dejana. 2000. Development of endothelial cell lines from embryonic stem cells: A tool for studying genetically manipulated endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1443-51.
- Baldessari, D., and M. Mione. 2008. How to create the vascular tree? (Latest) help from the zebrafish. *Pharmacol Ther.* 118:206-30.
- Bardin, N., F. Anfosso, J.M. Masse, E. Cramer, F. Sabatier, A. Le Bivic, J. Sampol, and F. Dignat-George. 2001. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood.* 98:3677-84.
- Barker, N., and H. Clevers. 2000. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays.* 22:961-5.
- Bauer, R., and A.K. Bosserhoff. 2006. Functional implication of truncated P-cadherin expression in malignant melanoma. *Exp Mol Pathol.* 81:224-30.
- Bauer, R., R. Hein, and A.K. Bosserhoff. 2005. A secreted form of P-cadherin is expressed in malignant melanoma. *Exp Cell Res.* 305:418-26.
- Bauer, R., P.J. Wild, S. Meyer, F. Bataille, A. Pauer, M. Klinkhammer-Schalke, F. Hofstaedter, and A.K. Bosserhoff. 2006. Prognostic relevance of P-cadherin expression in melanocytic skin tumours analysed by high-throughput tissue microarrays. *J Clin Pathol.* 59:699-705.
- Baumeister, U., R. Funke, K. Ebnet, H. Vorschmitt, S. Koch, and D. Vestweber. 2005. Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *Embo J.* 24:1686-95.
- Baumer, S., L. Keller, A. Holtmann, R. Funke, B. August, A. Gamp, H. Wolburg, K. Wolburg-Buchholz, U. Deutsch, and D. Vestweber. 2006. Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood.* 107:4754-62.
- Bazzoni, G. 2003. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 15:525-30.
- Beasley, G.M., N. McMahon, G. Sanders, C.K. Augustine, M.A. Selim, B. Peterson, R. Norris, W.P. Peters, M.I. Ross, and D.S. Tyler. 2009. A phase 1 study of systemic ADH-1 in combination with melphalan via isolated limb infusion in patients with locally advanced in-transit malignant melanoma. *Cancer.* 115:4766-74.

- Behrens, J., M.M. Mareel, F.M. Van Roy, and W. Birchmeier. 1989. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 108:2435-47.
- Belanger, M., T. Asashima, S. Ohtsuki, H. Yamaguchi, S. Ito, and T. Terasaki. 2007. Hyperammonemia induces transport of taurine and creatine and suppresses claudin-12 gene expression in brain capillary endothelial cells in vitro. *Neurochem Int.* 50:95-101.
- Bergers, G., and L.E. Benjamin. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3:401-10.
- Bibert, S., M. Jaquinod, E. Concord, C. Ebel, E. Hewat, C. Vanbelle, P. Legrand, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac. 2002. Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions. *J Biol Chem.* 277:12790-801.
- Biswas, P., S. Canosa, D. Schoenfeld, J. Schoenfeld, P. Li, L.C. Cheas, J. Zhang, A. Cordova, B. Sumpio, and J.A. Madri. 2006. PECAM-1 affects GSK-3 β -mediated β -catenin phosphorylation and degradation. *Am J Pathol.* 169:314-24.
- Biswas, P., S. Canosa, J. Schoenfeld, D. Schoenfeld, A. Tucker, and J.A. Madri. 2003. PECAM-1 promotes β -catenin accumulation and stimulates endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 303:212-8.
- Blaschuk, O.W., R. Sullivan, S. David, and Y. Pouliot. 1990. Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol.* 139:227-9.
- Blum, Y., H.G. Belting, E. Ellertsdottir, L. Herwig, F. Luders, and M. Affolter. 2008. Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol.* 316:312-22.
- Boda-Heggemann, J., A. Regnier-Vigouroux, and W.W. Franke. 2009. Beyond vessels: occurrence and regional clustering of vascular endothelial (VE)-cadherin-containing junctions in non-endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 335:49-65.
- Boggon, T.J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B.M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science.* 296:1308-13.
- Bouras, T., M.P. Lisanti, and R.G. Pestell. 2004. Caveolin-1 in breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 3:931-41.
- Breier, G., F. Breviario, L. Caveda, R. Berthier, H. Schnurch, U. Gotsch, D. Vestweber, W. Risau, and E. Dejana. 1996. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood.* 87:630-41.
- Brown, D.A., and J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68:533-44.

- Bruses, J.L. 2000. Cadherin-mediated adhesion at the interneuronal synapse. *Curr Opin Cell Biol.* 12:593-7.
- Bruses, J.L. 2006. N-cadherin signaling in synapse formation and neuronal physiology. *Mol Neurobiol.* 33:237-52.
- Caduff, J.H., L.C. Fischer, and P.H. Burri. 1986. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec.* 216:154-64.
- Calkins, C.C., B.L. Hoepner, C.M. Law, M.R. Novak, S.V. Setzer, M. Hatzfeld, and A.P. Kowalczyk. 2003. The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein. *J Biol Chem.* 278:1774-83.
- Cao, G., M.L. Fehrenbach, J.T. Williams, J.M. Finklestein, J.X. Zhu, and H.M. Delisser. 2009. Angiogenesis in platelet endothelial cell adhesion molecule-1-null mice. *Am J Pathol.* 175:903-15.
- Cao, G., C.D. O'Brien, Z. Zhou, S.M. Sanders, J.N. Greenbaum, A. Makrigiannakis, and H.M. DeLisser. 2002. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C1181-90.
- Carmeliet, P., and D. Collen. 1999. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237:133-58.
- Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oosthuysen, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M.C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J.M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 98:147-57.
- Causseret, M., N. Taulet, F. Comunale, C. Favard, and C. Gauthier-Rouviere. 2005. N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts. *Mol Biol Cell.* 16:2168-80.
- Cavallaro, U., S. Liebner, and E. Dejana. 2006. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res.* 312:659-67.
- Caveda, L., I. Martin-Padura, P. Navarro, F. Breviario, M. Corada, D. Gulino, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1996. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest.* 98:886-93.
- Cepek, K.L., S.K. Shaw, C.M. Parker, G.J. Russell, J.S. Morrow, D.L. Rimm, and M.B. Brenner. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature.* 372:190-3.

- Charrasse, S., M. Meriane, F. Comunale, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere. 2002. N-cadherin-dependent cell-cell contact regulates Rho GTPases and beta-catenin localization in mouse C2C12 myoblasts. *J Cell Biol.* 158:953-65.
- Chartier, N.T., C.I. Oddou, M.G. Laine, B. Ducarouge, C.A. Marie, M.R. Block, and M.R. Jacquier-Sarlin. 2007. Cyclin-dependent kinase 2/cyclin E complex is involved in p120 catenin (p120ctn)-dependent cell growth control: a new role for p120ctn in cancer. *Cancer Res.* 67:9781-90.
- Chauvet, N., M. Prieto, C. Fabre, N.K. Noren, and A. Privat. 2003. Distribution of p120 catenin during rat brain development: potential role in regulation of cadherin-mediated adhesion and actin cytoskeleton organization. *Mol Cell Neurosci.* 22:467-86.
- Chen, C.P., S. Posy, A. Ben-Shaul, L. Shapiro, and B.H. Honig. 2005. Specificity of cell-cell adhesion by classical cadherins: Critical role for low-affinity dimerization through beta-strand swapping. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8531-6.
- Chen, X., S. Kojima, G.G. Borisy, and K.J. Green. 2003. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol.* 163:547-57.
- Cheng, S.L., C.S. Shin, D.A. Towler, and R. Civitelli. 2000. A dominant negative cadherin inhibits osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 15:2362-70.
- Chiasson, C.M., K.B. Wittich, P.A. Vincent, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2009. p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. *Mol Biol Cell.* 20:1970-80.
- Chichili, G.R., and W. Rodgers. 2009. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci.* 66:2319-28.
- Chitaev, N.A., and S.M. Troyanovsky. 1998. Adhesive but not lateral E-cadherin complexes require calcium and catenins for their formation. *J Cell Biol.* 142:837-46.
- Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9815-20.
- Corada, M., L. Zanetta, F. Orsenigo, F. Breviario, M.G. Lampugnani, S. Bernasconi, F. Liao, D.J. Hicklin, P. Bohlen, and E. Dejana. 2002. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood.* 100:905-11.
- Crampton, S.P., B. Wu, E.J. Park, J.H. Kim, C. Solomon, M.L. Waterman, and C.C. Hughes. 2009. Integration of the beta-catenin-dependent Wnt pathway with integrin signaling through the adaptor molecule Grb2. *PLoS One.* 4:e7841.

- Dangerfield, J., K.Y. Larbi, M.T. Huang, A. Dewar, and S. Nourshargh. 2002. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J Exp Med*. 196:1201-11.
- Daniel, C.W., P. Strickland, and Y. Friedmann. 1995. Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mammary ductal morphogenesis and growth. *Dev Biol*. 169:511-9.
- Daniel, J.M. 2007. Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta*. 1773:59-68.
- Daniel, J.M., and A.B. Reynolds. 1999. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol*. 19:3614-23.
- Davis, M.A., R.C. Ireton, and A.B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*. 163:525-34.
- Dejana, E., F. Orsenigo, and M.G. Lampugnani. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*. 121:2115-22.
- Dejana, E., F. Orsenigo, C. Molendini, P. Baluk, and D.M. McDonald. 2009. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell Tissue Res*. 335:17-25.
- Deleuze, V., E. Chalhoub, R. El-Hajj, C. Dohet, M. Le Clech, P.O. Couraud, P. Huber, and D. Mathieu. 2007. TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells. *Mol Cell Biol*. 27:2687-97.
- DeLisser, H.M., M. Christofidou-Solomidou, R.M. Strieter, M.D. Burdick, C.S. Robinson, R.S. Wexler, J.S. Kerr, C. Garlanda, J.R. Merwin, J.A. Madri, and S.M. Albelda. 1997. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol*. 151:671-7.
- Delva, E., and A.P. Kowalczyk. 2009. Regulation of cadherin trafficking. *Traffic*. 10:259-67.
- Dimaio, T.A., S. Wang, Q. Huang, E.A. Scheef, C.M. Sorenson, and N. Sheibani. 2008. Attenuation of retinal vascular development and neovascularization in PECAM-1-deficient mice. *Dev Biol*. 315:72-88.
- Dodelet-Devillers, A., R. Cayrol, J. van Horssen, A.S. Haqqani, H.E. de Vries, B. Engelhardt, J. Greenwood, and A. Prat. 2009. Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *J Mol Med*. 87:765-74.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*. 123:903-15.
- Duncan, G.S., D.P. Andrew, H. Takimoto, S.A. Kaufman, H. Yoshida, J. Spellberg, J. Luis de la Pompa, A. Elia, A. Wakeham, B. Karan-Tamir, W.A. Muller, G. Senaldi, M.M. Zukowski, and T.W. Mak. 1999. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial

- cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol.* 162:3022-30.
- El Sayegh, T.Y., P.D. Arora, L. Fan, C.A. Laschinger, P.A. Greer, C.A. McCulloch, and A. Kapus. 2005. Phosphorylation of N-cadherin-associated cortactin by Fer kinase regulates N-cadherin mobility and intercellular adhesion strength. *Mol Biol Cell.* 16:5514-27.
- El Sayegh, T.Y., P.D. Arora, C.A. Laschinger, W. Lee, C. Morrison, C.M. Overall, A. Kapus, and C.A. McCulloch. 2004. Cortactin associates with N-cadherin adhesions and mediates intercellular adhesion strengthening in fibroblasts. *J Cell Sci.* 117:5117-31.
- Eliceiri, B.P., and D.A. Cheresh. 1999. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest.* 103:1227-30.
- Epand, R.M. 2008. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim Biophys Acta.* 1778:1576-82.
- Erez, N., E. Zamir, B.J. Gour, O.W. Blaschuk, and B. Geiger. 2004. Induction of apoptosis in cultured endothelial cells by a cadherin antagonist peptide: involvement of fibroblast growth factor receptor-mediated signalling. *Exp Cell Res.* 294:366-78.
- Feraud, O., Y. Cao, and D. Vittet. 2001. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab Invest.* 81:1669-81.
- Feraud, O., M.H. Prandini, and D. Vittet. 2003. Vasculogenesis and angiogenesis from in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Methods Enzymol.* 365:214-28.
- Feraud, O., and D. Vittet. 2003. Murine embryonic stem cell in vitro differentiation: applications to the study of vascular development. *Histol Histopathol.* 18:191-9.
- Ferber, A., C. Yaen, E. Sarmiento, and J. Martinez. 2002. An octapeptide in the juxtamembrane domain of VE-cadherin is important for p120^{ctn} binding and cell proliferation. *Exp Cell Res.* 274:35-44.
- Ferrari, S.L., K. Traianedes, M. Thorne, M.H. Lafage-Proust, P. Genever, M.G. Cecchini, V. Behar, A. Bisello, M. Chorev, M. Rosenblatt, and L.J. Suva. 2000. A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J Bone Miner Res.* 15:198-208.
- Ferreri, D.M., F.L. Minnear, T. Yin, A.P. Kowalczyk, and P.A. Vincent. 2008. N-cadherin levels in endothelial cells are regulated by monolayer maturity and p120 availability. *Cell Commun Adhes.* 15:333-49.
- Fiucci, G., D. Ravid, R. Reich, and M. Liscovitch. 2002. Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene.* 21:2365-75.
- Flores-Borja, F., P.S. Kabouridis, E.C. Jury, D.A. Isenberg, and R.A. Mageed. 2005. Decreased Lyn expression and translocation to lipid raft signaling domains in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 52:3955-65.

- Fong, G.H., J. Rossant, M. Gertsenstein, and M.L. Breitman. 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 376:66-70.
- Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H.E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer, and W. Birchmeier. 2002. Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol*. 4:222-31.
- Gajate, C., R.I. Fonteriz, C. Cabaner, G. Alvarez-Noves, Y. Alvarez-Rodriguez, M. Modolell, and F. Mollinedo. 2000. Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer*. 85:674-82.
- Gajate, C., F. Gonzalez-Camacho, and F. Mollinedo. 2009. Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 380:780-4.
- Gajate, C., and F. Mollinedo. 2005. Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. *J Biol Chem*. 280:11641-7.
- Gan, Y., Y.H. Shen, J. Wang, X. Wang, B. Utama, J. Wang, and X.L. Wang. 2005. Role of histone deacetylation in cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 280:16467-75.
- Garrido-Urbani, S., P.F. Bradfield, B.P. Lee, and B.A. Imhof. 2008. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. *Biochem Soc Trans*. 36:203-11.
- Gates, J., and M. Peifer. 2005. Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell*. 123:769-72.
- Gavard, J. 2009. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett*. 583:1-6.
- Gavard, J., and J.S. Gutkind. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 8:1223-34.
- Gavard, J., and J.S. Gutkind. 2008. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol*. 10:883-5.
- Gavard, J., M. Lambert, I. Grosheva, V. Marthiens, T. Irinopoulou, J.F. Riou, A. Bershadsky, and R.M. Mege. 2004. Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci*. 117:257-70.
- Gerhardt, H., and C. Betsholtz. 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 314:15-23.
- Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, and C. Betsholtz. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 161:1163-77.

- Gerhardt, H., H. Wolburg, and C. Redies. 2000. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn.* 218:472-9.
- Gory-Faure, S., M.H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet, and P. Huber. 1999. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development.* 126:2093-102.
- Grazia Lampugnani, M., A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T.O. Daniel, and E. Dejana. 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol.* 161:793-804.
- Gumina, R.J., N.E. Kirschbaum, K. Piotrowski, and P.J. Newman. 1997. Characterization of the human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 promoter: identification of a GATA-2 binding element required for optimal transcriptional activity. *Blood.* 89:1260-9.
- Hansen, S.M., V. Berezin, and E. Bock. 2008. Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Cell Mol Life Sci.* 65:3809-21.
- Harder, T., P. Scheiffele, P. Verkade, and K. Simons. 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol.* 141:929-42.
- Harhaj, N.S., and D.A. Antonetti. 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1206-37.
- Hay, E., E. Laplantine, V. Geoffroy, M. Frain, T. Kohler, R. Muller, and P.J. Marie. 2009a. N-cadherin interacts with axin and LRP5 to negatively regulate Wnt/beta-catenin signaling, osteoblast function, and bone formation. *Mol Cell Biol.* 29:953-64.
- Hay, E., A. Nouraud, and P.J. Marie. 2009b. N-cadherin negatively regulates osteoblast proliferation and survival by antagonizing Wnt, ERK and PI3K/Akt signalling. *PLoS One.* 4:e8284.
- Hayashi, H., N. Kimura, H. Yamaguchi, K. Hasegawa, T. Yokoseki, M. Shibata, N. Yamamoto, M. Michikawa, Y. Yoshikawa, K. Terao, K. Matsuzaki, C.A. Lemere, D.J. Selkoe, H. Naiki, and K. Yanagisawa. 2004. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci.* 24:4894-902.
- Heath, V.L., and R. Bicknell. 2009. Anticancer strategies involving the vasculature. *Nat Rev Clin Oncol.* 6:395-404.
- Hendrix, M.J., E.A. Seftor, P.S. Meltzer, L.M. Gardner, A.R. Hess, D.A. Kirschmann, G.C. Schatteman, and R.E. Seftor. 2001. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:8018-23.

- Hermant, B., S. Bibert, E. Concord, B. Dublet, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac. 2003. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem.* 278:14002-12.
- Hewat, E.A., C. Durmort, L. Jacquamet, E. Concord, and D. Gulino-Debrac. 2007. Architecture of the VE-cadherin hexamer. *J Mol Biol.* 365:744-51.
- Heyraud, S., M. Jaquinod, C. Durmort, E. Dambroise, E. Concord, J.P. Schaal, P. Huber, and D. Gulino-Debrac. 2008. Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions. *Mol Cell Biol.* 28:1657-68.
- Hirai, Y., A. Nose, S. Kobayashi, and M. Takeichi. 1989a. Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. I. Lung epithelial morphogenesis. *Development.* 105:263-70.
- Hirai, Y., A. Nose, S. Kobayashi, and M. Takeichi. 1989b. Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis. *Development.* 105:271-7.
- Hoch, R.V., and P. Soriano. 2003. Roles of PDGF in animal development. *Development.* 130:4769-84.
- Huang, M.T., K.Y. Larbi, C. Scheiermann, A. Woodfin, N. Gerwin, D.O. Haskard, and S. Nourshargh. 2006. ICAM-2 mediates neutrophil transmigration in vivo: evidence for stimulus specificity and a role in PECAM-1-independent transmigration. *Blood.* 107:4721-7.
- Hulit, J., K. Suyama, S. Chung, R. Keren, G. Agiostratidou, W. Shan, X. Dong, T.M. Williams, M.P. Lisanti, K. Knudsen, and R.B. Hazan. 2007. N-cadherin signaling potentiates mammary tumor metastasis via enhanced extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res.* 67:3106-16.
- Hur, J.Y., H. Welander, H. Behbahani, M. Aoki, J. Franberg, B. Winblad, S. Frykman, and L.O. Tjernberg. 2008. Active gamma-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *Febs J.* 275:1174-87.
- Ilan, N., L. Cheung, E. Pinter, and J.A. Madri. 2000. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem.* 275:21435-43.
- Ilan, N., and J.A. Madri. 2003. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol.* 15:515-24.
- Ilan, N., S. Mahooti, D.L. Rimm, and J.A. Madri. 1999. PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin. *J Cell Sci.* 112 Pt 18:3005-14.

- Illi, B., A. Scopece, S. Nanni, A. Farsetti, L. Morgante, P. Biglioli, M.C. Capogrossi, and C. Gaetano. 2005. Epigenetic histone modification and cardiovascular lineage programming in mouse embryonic stem cells exposed to laminar shear stress. *Circ Res.* 96:501-8.
- Ireton, R.C., M.A. Davis, J. van Hengel, D.J. Mariner, K. Barnes, M.A. Thoreson, P.Z. Anastasiadis, L. Matrisian, L.M. Bundy, L. Sealy, B. Gilbert, F. van Roy, and A.B. Reynolds. 2002. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol.* 159:465-76.
- Ishida, T., R.K. Kundu, E. Yang, K. Hirata, Y.D. Ho, and T. Quertermous. 2003. Targeted disruption of endothelial cell-selective adhesion molecule inhibits angiogenic processes in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 278:34598-604.
- Islam, S., T.E. Carey, G.T. Wolf, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 1996. Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol.* 135:1643-54.
- Iurlaro, M., F. Demontis, M. Corada, L. Zanetta, C. Drake, M. Gariboldi, S. Peiro, A. Cano, P. Navarro, A. Cattelino, S. Tognin, P.C. Marchisio, and E. Dejana. 2004. VE-cadherin expression and clustering maintain low levels of survivin in endothelial cells. *Am J Pathol.* 165:181-9.
- Iwabuchi, K., K. Handa, and S. Hakomori. 1998. Separation of "glycosphingolipid signaling domain" from caveolin-containing membrane fraction in mouse melanoma B16 cells and its role in cell adhesion coupled with signaling. *J Biol Chem.* 273:33766-73.
- Iyer, S., D.M. Ferreri, N.C. DeCocco, F.L. Minnear, and P.A. Vincent. 2004. VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286:L1143-53.
- Jacobson, K., E.D. Sheets, and R. Simson. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science.* 268:1441-2.
- Jaggi, M., M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2002. Differential displacement of classical cadherins by VE-cadherin. *Cell Commun Adhes.* 9:103-15.
- Jain, R.K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 9:685-93.
- Janes, P.W., S.C. Ley, A.I. Magee, and P.S. Kabouridis. 2000. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin Immunol.* 12:23-34.
- Jury, E.C., and P.S. Kabouridis. 2004. T-lymphocyte signalling in systemic lupus erythematosus: a lipid raft perspective. *Lupus.* 13:413-22.
- Kakio, A., S.I. Nishimoto, K. Yanagisawa, Y. Kozutsumi, and K. Matsuzaki. 2001. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J Biol Chem.* 276:24985-90.

- Kamei, J., T. Toyofuku, and M. Hori. 2003. Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 312:380-7.
- Kamei, M., W.B. Saunders, K.J. Bayless, L. Dye, G.E. Davis, and B.M. Weinstein. 2006. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature.* 442:453-6.
- Karpen, H.E., J.T. Bukowski, T. Hughes, J.P. Gratton, W.C. Sessa, and M.R. Gailani. 2001. The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane. *J Biol Chem.* 276:19503-11.
- Keyt, B.A., H.V. Nguyen, L.T. Berleau, C.M. Duarte, J. Park, H. Chen, and N. Ferrara. 1996. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem.* 271:5638-46.
- Khakoo, A.Y., and T. Finkel. 2005. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med.* 56:79-101.
- Kirton, J.P., and Q. Xu. 2010. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc Res.*
- Kobielak, A., and E. Fuchs. 2004. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:614-25.
- Koh, W., A.N. Stratman, A. Sacharidou, and G.E. Davis. 2008. In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. *Methods Enzymol.* 443:83-101.
- Konstantoulaki, M., P. Kouklis, and A.B. Malik. 2003. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285:L434-42.
- Kopp, H.G., S. Patel, B. Brucher, and J.T. Hartmann. 2008. Potential combination chemotherapy approaches for advanced adult-type soft-tissue sarcoma. *Am J Clin Dermatol.* 9:207-17.
- Korff, T., and H.G. Augustin. 1998. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 143:1341-52.
- Korff, T., and H.G. Augustin. 1999. Tensional forces in fibrillar extracellular matrices control directional capillary sprouting. *J Cell Sci.* 112 (Pt 19):3249-58.
- Kowalczyk, A.P., and A.B. Reynolds. 2004. Protecting your tail: regulation of cadherin degradation by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 16:522-7.
- Lagunowich, L.A., and G.B. Grunwald. 1989. Expression of calcium-dependent cell adhesion during ocular development: a biochemical, histochemical and functional analysis. *Dev Biol.* 135:158-71.

- Lambeng, N., Y. Wallez, C. Rampon, F. Cand, G. Christe, D. Gulino-Debrac, I. Vilgrain, and P. Huber. 2005. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res.* 96:384-91.
- Lambert, D., C.A. O'Neill, and P.J. Padfield. 2007. Methyl-beta-cyclodextrin increases permeability of Caco-2 cell monolayers by displacing specific claudins from cholesterol rich domains associated with tight junctions. *Cell Physiol Biochem.* 20:495-506.
- Lambert, M., D. Choquet, and R.M. Mege. 2002. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157:469-79.
- Lambert, M., F. Padilla, and R.M. Mege. 2000. Immobilized dimers of N-cadherin-Fc chimera mimic cadherin-mediated cell contact formation: contribution of both outside-in and inside-out signals. *J Cell Sci.* 113 (Pt 12):2207-19.
- Lambert, O., J.C. Taveau, J.L. Him, R. Al Kurdi, D. Gulino-Debrac, and A. Brisson. 2005. The basic framework of VE-cadherin junctions revealed by cryo-EM. *J Mol Biol.* 346:1193-6.
- Lampugnani, M.G., M. Corada, P. Andriopoulou, S. Esser, W. Risau, and E. Dejana. 1997. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci.* 110 (Pt 17):2065-77.
- Lampugnani, M.G., and E. Dejana. 2007. Adherens junctions in endothelial cells regulate vessel maintenance and angiogenesis. *Thromb Res.* 120 Suppl 2:S1-6.
- Lampugnani, M.G., F. Orsenigo, M.C. Gagliani, C. Tacchetti, and E. Dejana. 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.* 174:593-604.
- Lampugnani, M.G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L.P. Ruco, and E. Dejana. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol.* 118:1511-22.
- Langhorst, M.F., A. Reuter, and C.A. Stuermer. 2005. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci.* 62:2228-40.
- Langlet, C., A.M. Bernard, P. Drevot, and H.T. He. 2000. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr Opin Immunol.* 12:250-5.
- Lapierre, L.A., P.L. Tuma, J. Navarre, J.R. Goldenring, and J.M. Anderson. 1999. VAP-33 localizes to both an intracellular vesicle population and with occludin at the tight junction. *J Cell Sci.* 112 (Pt 21):3723-32.
- Leach, L., P. Clark, M.G. Lampugnani, A.G. Arroyo, E. Dejana, and J.A. Firth. 1993. Immunoelectron characterisation of the inter-endothelial junctions of human term placenta. *J Cell Sci.* 104 (Pt 4):1073-81.

- Leonard, M., Y. Chan, and A.S. Menko. 2008. Identification of a novel intermediate filament-linked N-cadherin/gamma-catenin complex involved in the establishment of the cytoarchitecture of differentiated lens fiber cells. *Dev Biol.* 319:298-308.
- Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn. 2001. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 61:3819-25.
- Liang, X., A. Nazarian, H. Erdjument-Bromage, W. Bornmann, P. Tempst, and M.D. Resh. 2001. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem.* 276:30987-94.
- Liao, F., J. Ali, T. Greene, and W.A. Muller. 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 185:1349-57.
- Liao, F., J.F. Doody, J. Overholser, B. Finnerty, R. Bassi, Y. Wu, E. Dejana, P. Kussie, P. Bohlen, and D.J. Hicklin. 2002. Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res.* 62:2567-75.
- Liao, F., H.K. Huynh, A. Eiroa, T. Greene, E. Polizzi, and W.A. Muller. 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med.* 182:1337-43.
- Liao, F., Y. Li, W. O'Connor, L. Zanetta, R. Bassi, A. Santiago, J. Overholser, A. Hooper, P. Mignatti, E. Dejana, D.J. Hicklin, and P. Bohlen. 2000. Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res.* 60:6805-10.
- Lilien, J., and J. Balsamo. 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol.* 17:459-65.
- Liu, H., S. Komiya, M. Shimizu, Y. Fukunaga, and A. Nagafuchi. 2007. Involvement of p120 carboxy-terminal domain in cadherin trafficking. *Cell Struct Funct.* 32:127-37.
- Lu, M., and R.S. Krauss. 2010. N-cadherin ligation, but not Sonic hedgehog binding, initiates Cdo-dependent p38alpha/beta MAPK signaling in skeletal myoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:4212-7.
- Luo, Y., and G.L. Radice. 2005. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 169:29-34.
- Luplertlop, N., D. Misse, D. Bray, V. Deleuze, J.P. Gonzalez, V. Leardkamolkarn, H. Yssel, and F. Veas. 2006. Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep.* 7:1176-81.
- Lyden, D., K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, W. Marks, L. Witte, Y. Wu, D. Hicklin, Z. Zhu, N.R. Hackett, R.G. Crystal, M.A. Moore, K.A. Hajjar, K. Manova, R. Benezra, and S. Rafii. 2001. Impaired recruitment of bone-

- marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 7:1194-201.
- Maeda, O., N. Usami, M. Kondo, M. Takahashi, H. Goto, K. Shimokata, K. Kusugami, and Y. Sekido. 2004. Plakoglobin (gamma-catenin) has TCF/LEF family-dependent transcriptional activity in beta-catenin-deficient cell line. *Oncogene.* 23:964-72.
- Maheshwari, R.K., V. Srikantan, D. Bhartiya, H.K. Kleinman, and D.S. Grant. 1991. Differential effects of interferon gamma and alpha on in vitro model of angiogenesis. *J Cell Physiol.* 146:164-9.
- Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 277:55-60.
- Marie, P.J. 2002. Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol.* 190:297-305.
- Mary, S., S. Charrasse, M. Meriane, F. Comunale, P. Travo, A. Blangy, and C. Gauthier-Rouviere. 2002. Biogenesis of N-cadherin-dependent cell-cell contacts in living fibroblasts is a microtubule-dependent kinesin-driven mechanism. *Mol Biol Cell.* 13:285-301.
- Matouk, C.C., and P.A. Marsden. 2008. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res.* 102:873-87.
- Matsuyoshi, N., K. Toda, Y. Horiguchi, T. Tanaka, S. Nakagawa, M. Takeichi, and S. Imamura. 1997. In vivo evidence of the critical role of cadherin-5 in murine vascular integrity. *Proc Assoc Am Physicians.* 109:362-71.
- McCaffrey, G., M.J. Seelbach, W.D. Staatz, N. Nametz, C. Quigley, C.R. Campos, T.A. Brooks, and T.P. Davis. 2008. Occludin oligomeric assembly at tight junctions of the blood-brain barrier is disrupted by peripheral inflammatory hyperalgesia. *J Neurochem.* 106:2395-409.
- McCaffrey, G., W.D. Staatz, C.A. Quigley, N. Nametz, M.J. Seelbach, C.R. Campos, T.A. Brooks, R.D. Egleton, and T.P. Davis. 2007. Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity in vivo. *J Neurochem.*
- Mege, R.M., J. Gavard, and M. Lambert. 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 18:541-8.
- Michel, V., and M. Bakovic. 2007. Lipid rafts in health and disease. *Biol Cell.* 99:129-40.
- Molander-Melin, M., K. Blennow, N. Bogdanovic, B. Dellheden, J.E. Mansson, and P. Fredman. 2005. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem.* 92:171-82.
- Mollinedo, F., J. de la Iglesia-Vicente, C. Gajate, A.E. de Mendoza, J.A. Villa-Pulgarin, M. de Frias, G. Roue, J. Gil, D. Colomer, M.A. Campanero, and M.J. Blanco-Prieto. In vitro

and In vivo Selective Antitumor Activity of Edelfosine against Mantle Cell Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia Involving Lipid Rafts. *Clin Cancer Res*.

- Montero-Balaguer, M., K. Swirsding, F. Orsenigo, F. Cotelli, M. Mione, and E. Dejana. 2009. Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos. *PLoS One*. 4:e5772.
- Moran, M., and M.C. Miceli. 1998. Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity*. 9:787-96.
- Morandat, S., M. Bortolato, and B. Roux. 2002. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1564:473-78.
- Mukai, A., T. Kurisaki, S.B. Sato, T. Kobayashi, G. Kondoh, and N. Hashimoto. 2009. Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells. *Exp Cell Res*. 315:3052-63.
- Nakada, M.T., K. Amin, M. Christofidou-Solomidou, C.D. O'Brien, J. Sun, I. Gurubhagavatula, G.A. Heavner, A.H. Taylor, C. Paddock, Q.H. Sun, J.L. Zehnder, P.J. Newman, S.M. Albelda, and H.M. DeLisser. 2000. Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. *J Immunol*. 164:452-62.
- Navarro, P., L. Caveda, F. Breviario, I. Mandoteanu, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem*. 270:30965-72.
- Navarro, P., L. Ruco, and E. Dejana. 1998. Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *J Cell Biol*. 140:1475-84.
- Nawroth, R., G. Poell, A. Ranft, S. Kloppe, U. Samulowitz, G. Fachinger, M. Golding, D.T. Shima, U. Deutsch, and D. Vestweber. 2002. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *Embo J*. 21:4885-95.
- Neuhaus, W., M. Wirth, V.E. Plattner, B. Germann, F. Gabor, and C.R. Noe. 2008. Expression of Claudin-1, Claudin-3 and Claudin-5 in human blood-brain barrier mimicking cell line ECV304 is inducible by glioma-conditioned media. *Neurosci Lett*. 446:59-64.
- Newman, P.J., and D.K. Newman. 2003. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:953-64.
- Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse, and S. Tsukita. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*. 161:653-60.

- Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* 299:551-72.
- Nose, A., A. Nagafuchi, and M. Takeichi. 1988. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. *Cell.* 54:993-1001.
- Nose, A., and M. Takeichi. 1986. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol.* 103:2649-58.
- Nottebaum, A.F., G. Cagna, M. Winderlich, A.C. Gamp, R. Linnepe, C. Polaschegg, K. Filippova, R. Lyck, B. Engelhardt, O. Kamenyeva, M.G. Bixel, S. Butz, and D. Vestweber. 2008. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med.* 205:2929-45.
- Nusrat, A., J.A. Chen, C.S. Foley, T.W. Liang, J. Tom, M. Cromwell, C. Quan, and R.J. Mersny. 2000a. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction. *J Biol Chem.* 275:29816-22.
- Nusrat, A., C.A. Parkos, P. Verkade, C.S. Foley, T.W. Liang, W. Innis-Whitehouse, K.K. Eastburn, and J.L. Madara. 2000b. Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci.* 113 (Pt 10):1771-81.
- O'Brien, C.D., G. Cao, A. Makrigiannakis, and H.M. DeLisser. 2004. Role of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs of PECAM-1 in PECAM-1-dependent cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C1103-13.
- Ozawa, M., and R. Kemler. 1998. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex. *J Biol Chem.* 273:6166-70.
- Paik, J.H., A. Skoura, S.S. Chae, A.E. Cowan, D.K. Han, R.L. Proia, and T. Hla. 2004. Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes Dev.* 18:2392-403.
- Paredes, J., A. Albergaria, J.T. Oliveira, C. Jeronimo, F. Milanezi, and F.C. Schmitt. 2005. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res.* 11:5869-77.
- Paredes, J., A.L. Correia, A.S. Ribeiro, A. Albergaria, F. Milanezi, and F.C. Schmitt. 2007. P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res.* 9:214.
- Parton, R.G. 1996. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* 8:542-8.
- Parton, R.G., M. Hanzal-Bayer, and J.F. Hancock. 2006. Biogenesis of caveolae: a structural model for caveolin-induced domain formation. *J Cell Sci.* 119:787-96.

- Parton, R.G., and K. Simons. 2007. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:185-94.
- Patan, S. 1998. TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res.* 56:1-21.
- Patel, S.D., C. Ciatto, C.P. Chen, F. Bahna, M. Rajebhosale, N. Arkus, I. Schieren, T.M. Jessell, B. Honig, S.R. Price, and L. Shapiro. 2006. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell.* 124:1255-68.
- Patlolla, J.M., M.V. Swamy, J. Raju, and C.V. Rao. 2004. Overexpression of caveolin-1 in experimental colon adenocarcinomas and human colon cancer cell lines. *Oncol Rep.* 11:957-63.
- Pece, S., and J.S. Gutkind. 2000. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem.* 275:41227-33.
- Peifer, M., P.D. McCrea, K.J. Green, E. Wieschaus, and B.M. Gumbiner. 1992. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol.* 118:681-91.
- Peifer, M., and A.S. Yap. 2003. Traffic control: p120-catenin acts as a gatekeeper to control the fate of classical cadherins in mammalian cells. *J Cell Biol.* 163:437-40.
- Peng, Y., and N. Jahroudi. 2003. The NFY transcription factor inhibits von Willebrand factor promoter activation in non-endothelial cells through recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem.* 278:8385-94.
- Perotti, A., C. Sessa, A. Mancuso, C. Noverasco, S. Cresta, A. Locatelli, M.L. Carcangiu, K. Passera, A. Braghetti, D. Scaramuzza, F. Zanaboni, A. Fasolo, G. Capri, M. Miani, W.P. Peters, and L. Gianni. 2009. Clinical and pharmacological phase I evaluation of Exherin (ADH-1), a selective anti-N-cadherin peptide in patients with N-cadherin-expressing solid tumours. *Ann Oncol.* 20:741-5.
- Pokutta, S., F. Drees, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2008. Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochem Soc Trans.* 36:141-7.
- Pokutta, S., K. Herrenknecht, R. Kemler, and J. Engel. 1994. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur J Biochem.* 223:1019-26.
- Popik, W., T.M. Alce, and W.C. Au. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol.* 76:4709-22.

- Porfiri, E., B. Rubinfeld, I. Albert, K. Hovanes, M. Waterman, and P. Polakis. 1997. Induction of a beta-catenin-LEF-1 complex by wnt-1 and transforming mutants of beta-catenin. *Oncogene*. 15:2833-9.
- Qi, J., N. Chen, J. Wang, and C.H. Siu. 2005. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell*. 16:4386-97.
- Qi, J., J. Wang, O. Romanyuk, and C.H. Siu. 2006. Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and beta-catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell*. 17:1261-72.
- Rabiet, M.J., J.L. Plantier, Y. Rival, Y. Genoux, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1996. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 16:488-96.
- Radice, G.L., H. Rayburn, H. Matsunami, K.A. Knudsen, M. Takeichi, and R.O. Hynes. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Dev Biol*. 181:64-78.
- Resh, M.D. 2004. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem*. 37:217-32.
- Resh, M.D. 2006. Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules. *Sci STKE*. 2006:re14.
- Ribatti, D., B. Nico, and E. Crivellato. 2009. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis*. 12:101-11.
- Ribeiro, A.S., A. Albergaria, B. Sousa, A.L. Correia, M. Bracke, R. Seruca, F.C. Schmitt, and J. Paredes. Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene*. 29:392-402.
- Riddell, D.R., G. Christie, I. Hussain, and C. Dingwall. 2001. Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts. *Curr Biol*. 11:1288-93.
- Rubio, M.E., C. Curcio, N. Chauvet, and J.L. Bruses. 2005. Assembly of the N-cadherin complex during synapse formation involves uncoupling of p120-catenin and association with presenilin 1. *Mol Cell Neurosci*. 30:118-30.
- Saffell, J.L., E.J. Williams, I.J. Mason, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1997. Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron*. 18:231-42.
- Saitou, M., M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 11:4131-42.
- Salomon, D., O. Ayalon, R. Patel-King, R.O. Hynes, and B. Geiger. 1992. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci*. 102 (Pt 1):7-17.

- Sandig, M., E.B. Voura, V.I. Kalnins, and C.H. Siu. 1997. Role of cadherins in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton*. 38:351-64.
- Sato, T.N., Y. Tozawa, U. Deutsch, K. Wolburg-Buchholz, Y. Fujiwara, M. Gendron-Maguire, T. Gridley, H. Wolburg, W. Risau, and Y. Qin. 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 376:70-4.
- Schulz, B., J. Pruessmeyer, T. Maretzky, A. Ludwig, C.P. Blobel, P. Saftig, and K. Reiss. 2008. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res*. 102:1192-201.
- Seveau, S., H. Bierne, S. Giroux, M.C. Prevost, and P. Cossart. 2004. Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol*. 166:743-53.
- Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman, and A.C. Schuh. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376:62-6.
- Shapiro, L., A.M. Fannon, P.D. Kwong, A. Thompson, M.S. Lehmann, G. Grubel, J.F. Legrand, J. Als-Nielsen, D.R. Colman, and W.A. Hendrickson. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 374:327-37.
- Shapiro, L., and W.I. Weis. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a003053.
- Sharma, P., R. Varma, R.C. Sarasij, Ira, K. Gousset, G. Krishnamoorthy, M. Rao, and S. Mayor. 2004. Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell*. 116:577-89.
- Shasby, D.M., D.R. Ries, S.S. Shasby, and M.C. Winter. 2002. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 282:L1330-8.
- Sheibani, N., C.M. Sorenson, and W.A. Frazier. 1999. Tissue specific expression of alternatively spliced murine PECAM-1 isoforms. *Dev Dyn*. 214:44-54.
- Shih, I.M. 1999. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol*. 189:4-11.
- Shimizu, T., T. Kagawa, T. Inoue, A. Nonaka, S. Takada, H. Aburatani, and T. Taga. 2008. Stabilized beta-catenin functions through TCF/LEF proteins and the Notch/RBP-Jkappa complex to promote proliferation and suppress differentiation of neural precursor cells. *Mol Cell Biol*. 28:7427-41.
- Shimoyama, Y., T. Yoshida, M. Terada, Y. Shimosato, O. Abe, and S. Hirohashi. 1989. Molecular cloning of a human Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule homologous to mouse placental cadherin: its low expression in human placental tissues. *J Cell Biol*. 109:1787-94.

- Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2008. ADH-1 suppresses N-cadherin-dependent pancreatic cancer progression. *Int J Cancer*. 122:71-7.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1:31-9.
- Sivasankar, S., B. Gumbiner, and D. Leckband. 2001. Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J*. 80:1758-68.
- Smart, E.J., G.A. Graf, M.A. McNiven, W.C. Sessa, J.A. Engelman, P.E. Scherer, T. Okamoto, and M.P. Lisanti. 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol*. 19:7289-304.
- Solovey, A.N., L. Gui, L. Chang, J. Enenstein, P.V. Browne, and R.P. Hebbel. 2001. Identification and functional assessment of endothelial P1H12. *J Lab Clin Med*. 138:322-31.
- Solowiej, A., P. Biswas, D. Graesser, and J.A. Madri. 2003. Lack of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 attenuates foreign body inflammation because of decreased angiogenesis. *Am J Pathol*. 162:953-62.
- Song, L., S. Ge, and J.S. Pachter. 2007. Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood*. 109:1515-23.
- Spagnuolo, R., M. Corada, F. Orsenigo, L. Zanetta, U. Deuschle, P. Sandy, C. Schneider, C.J. Drake, F. Breviario, and E. Dejana. 2004. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood*. 103:3005-12.
- Stebbens, S.J., A. Akhmanova, and A.S. Yap. 2009. Microtubules and cadherins: a neglected partnership. *Front Biosci*. 14:3159-67.
- Stebbens, S.J., A.D. Paterson, M.S. Crampton, A.M. Shewan, C. Ferguson, A. Akhmanova, R.G. Parton, and A.S. Yap. 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J Cell Sci*. 119:1801-11.
- Stepniak, E., G.L. Radice, and V. Vasioukhin. 2009. Adhesive and signaling functions of cadherins and catenins in vertebrate development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1:a002949.
- Strilic, B., T. Kucera, J. Eglinger, M.R. Hughes, K.M. McNagny, S. Tsukita, E. Dejana, N. Ferrara, and E. Lammert. 2009. The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell*. 17:505-15.
- Sui, X.F., T.D. Kiser, S.W. Hyun, D.J. Angelini, R.L. Del Vecchio, B.A. Young, J.D. Hasday, L.H. Romer, A. Passaniti, N.K. Tonks, and S.E. Goldblum. 2005. Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *Am J Pathol*. 166:1247-58.

- Sun, H.W., C.J. Li, H.Q. Chen, H.L. Lin, H.X. Lv, Y. Zhang, and M. Zhang. 2007. Involvement of integrins, MAPK, and NF-kappaB in regulation of the shear stress-induced MMP-9 expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 353:152-8.
- Suyama, K., I. Shapiro, M. Guttman, and R.B. Hazan. 2002. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell.* 2:301-14.
- Suzuki, S., K. Sano, and H. Tanihara. 1991. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul.* 2:261-70.
- Swiatek, P.J., and T. Gridley. 1993. Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene Krox20. *Genes Dev.* 7:2071-84.
- Taddei, A., C. Giampietro, A. Conti, F. Orsenigo, F. Breviario, V. Pirazzoli, M. Potente, C. Daly, S. Dimmeler, and E. Dejana. 2008. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol.* 10:923-34.
- Takeichi, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem.* 59:237-52.
- Takeichi, M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol.* 7:619-27.
- Tallquist, M.D., W.J. French, and P. Soriano. 2003. Additive effects of PDGF receptor beta signaling pathways in vascular smooth muscle cell development. *PLoS Biol.* 1:E52.
- Tamura, K., W.S. Shan, W.A. Hendrickson, D.R. Colman, and L. Shapiro. 1998. Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron.* 20:1153-63.
- Taulet, N., F. Comunale, C. Favard, S. Charrasse, S. Bodin, and C. Gauthier-Rouviere. 2009. N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis. *J Biol Chem.* 284:23137-45.
- Teng, J., T. Rai, Y. Tanaka, Y. Takei, T. Nakata, M. Hirasawa, A.B. Kulkarni, and N. Hirokawa. 2005. The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium. *Nat Cell Biol.* 7:474-82.
- Tepass, U. 1999. Genetic analysis of cadherin function in animal morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 11:540-8.
- Thoreson, M.A., P.Z. Anastasiadis, J.M. Daniel, R.C. Ireton, M.J. Wheelock, K.R. Johnson, D.K. Hummingbird, and A.B. Reynolds. 2000. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol.* 148:189-202.
- Thoumine, O., M. Lambert, R.M. Mege, and D. Choquet. 2006. Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol Biol Cell.* 17:862-75.

- Tillet, E., D. Vittet, O. Feraud, R. Moore, R. Kemler, and P. Huber. 2005. N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Exp Cell Res.* 310:392-400.
- Tran, N.L., D.G. Adams, R.R. Vaillancourt, and R.L. Heimark. 2002. Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem.* 277:32905-14.
- Tsukatani, Y., K. Suzuki, and K. Takahashi. 1997. Loss of density-dependent growth inhibition and dissociation of alpha-catenin from E-cadherin. *J Cell Physiol.* 173:54-63.
- Ukropec, J.A., M.K. Hollinger, S.M. Salva, and M.J. Woolkalis. 2000. SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J Biol Chem.* 275:5983-6.
- Van Marck, V., C. Stove, K. Van Den Bossche, V. Stove, J. Paredes, Y. Vander Haeghen, and M. Bracke. 2005. P-cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in human melanoma. *Cancer Res.* 65:8774-83.
- van Meer, G., and K. Simons. 1988. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem.* 36:51-8.
- Vecchi, A., C. Garlanda, M.G. Lampugnani, M. Resnati, C. Matteucci, A. Stoppacciaro, H. Schnurch, W. Risau, L. Ruco, A. Mantovani, and et al. 1994. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol.* 63:247-54.
- Verma, S.P. 2009. HIV: a raft-targeting approach for prevention and therapy using plant-derived compounds (review). *Curr Drug Targets.* 10:51-9.
- Vestweber, D. 2008. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:223-32.
- Vincent, P.A., K. Xiao, K.M. Buckley, and A.P. Kowalczyk. 2004. VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286:C987-97.
- Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana, and P. Huber. 1997. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:6273-8.
- Vokes, S.A., T.A. Yatskievych, R.L. Heimark, J. McMahon, A.P. McMahon, P.B. Antin, and P.A. Krieg. 2004. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development.* 131:4371-80.
- Wakelin, M.W., M.J. Sanz, A. Dewar, S.M. Albelda, S.W. Larkin, N. Boughton-Smith, T.J. Williams, and S. Nourshargh. 1996. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med.* 184:229-39.

- Wakita, H., S. Shirahama, and F. Furukawa. 1998. Distinct P-cadherin expression in cultured normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cell lines. *Microsc Res Tech.* 43:218-23.
- Wallez, Y., F. Cand, F. Cruzalegui, C. Wernstedt, S. Souchelnytskyi, I. Vilgrain, and P. Huber. 2007. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene.* 26:1067-77.
- Wallez, Y., and P. Huber. 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1778:794-809.
- Wang, J., W. Gunning, K.M. Kelley, and M. Ratnam. 2002. Evidence for segregation of heterologous GPI-anchored proteins into separate lipid rafts within the plasma membrane. *J Membr Biol.* 189:35-43.
- Wang, S., J.P. Dangerfield, R.E. Young, and S. Nourshargh. 2005. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *J Cell Sci.* 118:2067-76.
- Wang, Y., X. Su, C.M. Sorenson, and N. Sheibani. 2003. Tissue-specific distributions of alternatively spliced human PECAM-1 isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284:H1008-17.
- Waterman-Storer, C.M., W.C. Salmon, and E.D. Salmon. 2000. Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 11:2471-83.
- Webb, Y., L. Hermida-Matsumoto, and M.D. Resh. 2000. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 275:261-70.
- Wegmann, F., B. Petri, A.G. Khandoga, C. Moser, A. Khandoga, S. Volkery, H. Li, I. Nasdala, O. Brandau, R. Fassler, S. Butz, F. Krombach, and D. Vestweber. 2006. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. *J Exp Med.* 203:1671-7.
- Weis, S.M., and D.A. Cheresh. 2005. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature.* 437:497-504.
- Wessells, H., C.J. Sullivan, Y. Tsubota, K.L. Engel, B. Kim, N.E. Olson, D. Thorner, and K. Chitaley. 2009. Transcriptional profiling of human cavernosal endothelial cells reveals distinctive cell adhesion phenotype and role for claudin 11 in vascular barrier function. *Physiol Genomics.* 39:100-8.
- Williams, E., G. Williams, B.J. Gour, O.W. Blaschuk, and P. Doherty. 2000. A novel family of cyclic peptide antagonists suggests that N-cadherin specificity is determined by amino acids that flank the HAV motif. *J Biol Chem.* 275:4007-12.

- Williams, E.J., J. Furness, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1994. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*. 13:583-94.
- Williams, E.J., G. Williams, F.V. Howell, S.D. Skaper, F.S. Walsh, and P. Doherty. 2001. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J Biol Chem*. 276:43879-86.
- Williams, J.L., A. Weichert, A. Zakrzewicz, L. Da Silva-Azevedo, A.R. Pries, O. Baum, and S. Egginton. 2006. Differential gene and protein expression in abluminal sprouting and intraluminal splitting forms of angiogenesis. *Clin Sci (Lond)*. 110:587-95.
- Woodfin, A., C.A. Reichel, A. Khandoga, M. Corada, M.B. Voisin, C. Scheiermann, D.O. Haskard, E. Dejana, F. Krombach, and S. Nourshargh. 2007a. JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood*. 110:1848-56.
- Woodfin, A., M.B. Voisin, B.A. Imhof, E. Dejana, B. Engelhardt, and S. Nourshargh. 2009. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*. 113:6246-57.
- Woodfin, A., M.B. Voisin, and S. Nourshargh. 2007b. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27:2514-23.
- Wright, M., M. Aikawa, W. Szeto, and J. Papkoff. 1999. Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 263:384-8.
- Wu, J., F. Iwata, J.A. Grass, C.S. Osborne, L. Elnitski, P. Fraser, O. Ohneda, M. Yamamoto, and E.H. Bresnick. 2005. Molecular determinants of NOTCH4 transcription in vascular endothelium. *Mol Cell Biol*. 25:1458-74.
- Wu, P., X. Wang, F. Li, B. Qi, H. Zhu, S. Liu, Y. Cui, and J. Chen. 2008. Growth suppression of MCF-7 cancer cell-derived xenografts in nude mice by caveolin-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 376:215-20.
- Xavier, R., T. Brennan, Q. Li, C. McCormack, and B. Seed. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*. 8:723-32.
- Xiao, K., D.F. Allison, K.M. Buckley, M.D. Kottke, P.A. Vincent, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2003. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol*. 163:535-45.
- Xiao, K., J. Garner, K.M. Buckley, P.A. Vincent, C.M. Chiasson, E. Dejana, V. Faundez, and A.P. Kowalczyk. 2005. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell*. 16:5141-51.
- Xu, Z.X., T. Ding, V. Haridas, F. Connolly, and J.U. Gutterman. 2009. Avicin D, a plant triterpenoid, induces cell apoptosis by recruitment of Fas and downstream signaling molecules into lipid rafts. *PLoS One*. 4:e8532.

- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 123:889-901.
- Yan, X., Y. Lin, D. Yang, Y. Shen, M. Yuan, Z. Zhang, P. Li, H. Xia, L. Li, D. Luo, Q. Liu, K. Mann, and B.L. Bader. 2003. A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 102:184-91.
- Yanagisawa, M., I.N. Kaverina, A. Wang, Y. Fujita, A.B. Reynolds, and P.Z. Anastasiadis. 2004. A novel interaction between kinesin and p120 modulates p120 localization and function. *J Biol Chem*. 279:9512-21.
- Yang, S., J. Graham, J.W. Kahn, E.A. Schwartz, and M.E. Gerritsen. 1999. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol*. 155:887-95.
- Yap, A.S., C.M. Niessen, and B.M. Gumbiner. 1998. The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol*. 141:779-89.
- Yin, H.L., and P.A. Janmey. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol*. 65:761-89.
- Zampetaki, A., J.P. Kirton, and Q. Xu. 2008. Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*. 78:413-21.
- Zanetti, A., M.G. Lampugnani, G. Balconi, F. Breviario, M. Corada, L. Lanfrancone, and E. Dejana. 2002. Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22:617-22.
- Zheng, C., Y. Qiu, Q. Zeng, Y. Zhang, D. Lu, D. Yang, J. Feng, and X. Yan. 2009. Endothelial CD146 is required for in vitro tumor-induced angiogenesis: the role of a disulfide bond in signaling and dimerization. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:2163-72.

Alice GENTIL DIT MAURIN

Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine dans l'endothelium vasculaire

L'intégrité de l'endothelium vasculaire est maintenue par des structures d'adhérence jonctionnelle, notamment les jonctions adhérentes, dont la VE-cadhérine est le constituant majeur. Cette cadhérine est exclusivement exprimée dans les cellules endothéliales et joue un rôle clé au cours de la formation du plexus vasculaire. Les cellules endothéliales expriment également une autre cadhérine : la N-cadhérine. Bien que possédant une forte homologie structurale avec la VE-cadhérine, celle-ci possède une localisation subcellulaire originale pour une cadhérine classique puisqu'elle est localisée de manière diffuse au niveau de la membrane. Dans le développement vasculaire, elle pourrait ainsi permettre le recrutement des cellules murales par l'endothelium conduisant à la stabilisation du vaisseau.

Mon travail de thèse a été d'analyser les propriétés différentielles de ces deux cadhérines dans la cellule endothéliale ainsi que le mécanisme d'exclusion jonctionnelle de la N-cadhérine. Nous avons montré que la VE- et la N-cadhérine interagissent similairement à l' α - et à la β -caténine mais à l'inverse, p120 caténine lie préférentiellement la VE-cadhérine. Cette propriété confère à la VE-cadhérine la capacité d'exclure la N-cadhérine de la jonction interendothéliale. D'autre part, nous avons montré qu'une petite proportion de la VE-cadhérine est enchâssée dans des microdomaines riches en cholestérol : les radeaux lipidiques, à laquelle p120 est très fortement associée. Cette fraction pourrait représenter un pool de VE-cadhérine assurant la stabilité de la jonction et le maintien de la force cohésive entre cellules endothéliales.

Nous avons également montré dans un modèle de différenciation cellulaire dérivé des cellules ES murines (embryonic stem cell), que l'expression de la VE-cadhérine était nécessaire à l'expression d'autres gènes endothéliaux : PECAM, Flk-1 et Tie-1. La VE-cadhérine exercerait un contrôle transcriptionnel de l'expression de ces gènes mais le mécanisme exact de régulation n'a pas pu être décrypté.

L'ensemble de ce travail permet donc de montrer un autre visage de la VE-cadhérine dans la biologie de l'endothelium qui serait de réguler des protéines-clé de l'endothelium.

Mots-clés :

Cellules endothéliales, VE-cadhérine, N-cadhérine, angiogenèse, p120 caténine, radeaux de cholestérol, PECAM.

Alice GENTIL DIT MAURIN

Differential properties of N- and VE-cadherin in vascular endothelium

Endothelium integrity is maintained by junctional adhesion structures, in particular adherens junctions. Classical cadherins are the main molecule belonging to these structures. Two classical cadherins are expressed in the endothelium. First, the vascular endothelial cadherin or VE-cadherin is only expressed in endothelial cells and located to adherens junctions. Several studies have shown that this molecule is strictly necessary during vascular development. The second classical endothelial cadherin is represented by the neural cadherin or N-cadherin. Contrary to classical cadherins, the endothelial N-cadherin shows diffuse location on the entirely cell surface and interacts with mural cells for vessel stabilization. Moreover, its role in angiogenic process is still debated.

The purpose of our study was to decipher the differential role of N- and VE-cadherin in endothelial cells and during angiogenesis. We have shown that VE-cadherin was able to organize and displace N-cadherin location on the cell surface. Moreover, VE-cadherin binding to p120 catenin is required for N-cadherin junctional exclusion. Furthermore, endothelial lipid rafts, known to organize classical cadherin at the membrane, contain exclusively VE-cadherin, where it specifically binds p120 catenin. So, this protein complex could form a platform that stabilizes cadherin at the cell membrane and in the same way, strengthens intercellular interactions.

Also, we have found that three endothelial genes : PECAM, Flk-1 and Tie-2, could be transcriptionally controlled by VE-cadherin in a ES cell-derived endothelial differential model. We didn't found this molecular mechanism but, a cross talk between the VE-cadherin dependant PECAM regulation and adherens molecule to extracellular matrix is possible.

In the end, we characterized a new role of VE-cadherin. This adherent molecule might be crucial to endothelium biology, especially in the control of important endothelial proteins.

Key words:

Endothelial cells, VE-cadherin, N-cadherin, angiogenèse, p120 catenin, lipid raft, PECAM.

Alice GENTIL DIT MAURIN

Propriétés différentielles de la VE- et de la N-cadhérine dans l'endothelium vasculaire

L'intégrité de l'endothelium vasculaire est maintenue par des structures d'adhérence jonctionnelle, notamment les jonctions adhérentes, dont la VE-cadhérine est le constituant majeur. Cette cadhérine est exclusivement exprimée dans les cellules endothéliales et joue un rôle clé au cours de la formation du plexus vasculaire. Les cellules endothéliales expriment également une autre cadhérine : la N-cadhérine. Bien que possédant une forte homologie structurale avec la VE-cadhérine, celle-ci possède une localisation subcellulaire originale pour une cadhérine classique puisqu'elle est localisée de manière diffuse au niveau de la membrane. Dans le développement vasculaire, elle pourrait ainsi permettre le recrutement des cellules murales par l'endothelium conduisant à la stabilisation du vaisseau.

Mon travail de thèse a été d'analyser les propriétés différentielles de ces deux cadhérines dans la cellule endothéliale ainsi que le mécanisme d'exclusion jonctionnelle de la N-cadhérine. Nous avons montré que la VE- et la N-cadhérine interagissent similairement à l' α - et à la β -caténine mais à l'inverse, p120 caténine lie préférentiellement la VE-cadhérine. Cette propriété confère à la VE-cadhérine la capacité d'exclure la N-cadhérine de la jonction interendothéliale. D'autre part, nous avons montré qu'une petite proportion de la VE-cadhérine est enchâssée dans des microdomaines riches en cholestérol : les radeaux lipidiques, à laquelle p120 est très fortement associée. Cette fraction pourrait représenter un pool de VE-cadhérine assurant la stabilité de la jonction et le maintien de la force cohésive entre cellules endothéliales.

Nous avons également montré dans un modèle de différenciation cellulaire dérivé des cellules ES murines (embryonic stem cell), que l'expression de la VE-cadhérine était nécessaire à l'expression d'autres gènes endothéliaux : PECAM, Flk-1 et Tie-1. La VE-cadhérine exercerait un contrôle transcriptionnel de l'expression de ces gènes mais le mécanisme exact de régulation n'a pas pu être décrypté.

L'ensemble de ce travail permet donc de montrer un autre visage de la VE-cadhérine dans la biologie de l'endothelium qui serait de réguler des protéines-clé de l'endothelium.

Mots-clés :

Cellules endothéliales, VE-cadhérine, N-cadhérine, angiogenèse, p120 caténine, radeaux de cholestérol, PECAM.